

Departement für Pferde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst, Dipl. ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Center for Applied Biotechnology and Molecular Medicine (CABMM)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

*Periosteal Stripping bei Tieren mit Knochenlängenwachstumsstörungen
- eine Studie an Schafen*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Silvie Valérie Tanner
Tierärztin
aus Meilen, Schweiz

genehmigt auf Antrag von
Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin
Prof. em. Dr. med. vet. Hans Geyer, Korreferent

Zürich 2014

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	5
Summary	6
1 Einleitung.....	7
1.1 Angular Limb Deformity ALD	7
1.1.1 Problem	7
1.1.2 Ziel der Arbeit.....	7
2 Literatur.....	9
2.1 Definition ALD	9
2.2 Ätiologie	10
2.3 Therapie	11
2.3.1 Konservative Therapieformen	11
2.3.2 Chirurgische Therapieformen	11
2.3.3 Knochenentwicklung.....	14
2.4 Molekularbiologische Mechanismen.....	15
3 Material und Methoden	18
3.1 Ablauf der Studie	18
3.2 Schafvorbereitung.....	18
3.3 Operation	19
3.4 Probengewinnung.....	22
3.5 Probenaufbereitung	22
3.6 Histologie	24
3.7 Statistik.....	27
4 Ergebnisse	28
4.1 Operation und postoperative Phase	28
4.2 Probenaufbereitung.....	28
4.3 Histologische Auswertung.....	28
4.3.1 Immunhistologische Auswertung: Ihh (Indian hedgehog)	29
4.3.2 Immunhistologische Auswertung: TGF β (Transforming Growth Factor).....	30
4.3.3 Immunhistologische Auswertung: PTHR (Parathyroid Hormone Receptor)	31
4.3.4 Immunhistologische Auswertung: PTHrP (Parathyroid related Proteine)	32
4.3.5 Immunhistologische Auswertung: FGF $_2$ (Fibroblast Growth Factor)	34
4.3.6 Messungen Perichondrium	35
4.3.7 Quantitative Längenmessung der Growth Plate.....	35

5	Interpretation	37
5.1.1	Allgemein	37
5.1.2	Immunhistologie Ihh (Indian hedgehog)	38
5.1.3	Immunhistologie PTHrP (Parathyroid related Proteine)	39
5.1.4	Immunhistologie PTHR (Parathyroid Hormone Receptor)	40
5.1.5	Immunhistologie TGF β (Transforming Growth Factor)	41
5.1.6	Immunhistologie FGF $_2$ (Fibroblast Growth Factor)	42
6	Tabellen	44
7	Diskussion	59
7.1	Versuchsanordnung	59
7.2	Die PTE als Operations- & Versuchsmethode	60
7.3	Wahl der OP-Lokalisation & Technik	60
7.4	Kommentare zum Schmerzmanagement	61
7.5	Probenentnahme & -Bearbeitung	61
7.6	Mikroskopische Beurteilung	62
7.7	Diskussion der Ergebnisse	63
8	Schlusswort	65
	Literaturverzeichnis	66
	Abkürzungsverzeichnis	69
	Abbildungsverzeichnis	70
	Danksagung	71
	Curriculum Vitae	72

Zusammenfassung

Anhand der hier dokumentierten Studie wurden erstmals auf molekularbiologischer Ebene mittels immunhistologischer Techniken die Auswirkungen eines „Periosteal Stripping“ (Periosteal Transection and Elevation PTE) auf die Wachstumsfaktoren der juvenilen Epiphysenfuge untersucht. Insbesondere interessierte, ob die PTE eine nachweislich wirksame Methode darstellt, um bei Tieren mit Angular Limb Deformities (ALD) eine korrektive Wachstumsacceleration zu erwirken. ALD ist ein relativ häufiges orthopädisches Problem bei Fohlen und zeigt sich in Achsenfehlstellungen der Vorder- und/oder Hintergliedmassen, ausgehend von der Wachstumsfuge. Es wurde ein Tiermodell mit 12 Lämmern, welche einseitig an jeweils vier Lokalisationen (Radius, Tibia, Metacarpus III und Metatarsus III) operiert wurden, angewendet. Da die Mechanismen, welche das Knochenlängenwachstum auf Ebene der Epiphysenfuge bestimmen elementar sind, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Studienergebnisse auch auf Pferde übertragen lassen. In Zeitintervallen von 2, 6, 10, 14, 18 und 21 Tagen post Operationem wurden je zwei Schafe geschlachtet. Die Proben wurden morphologisch und immunhistologisch, und in einer Folgestudie histomorphometrisch beurteilt.

Immunhistologisch wurden folgende Signaltransduktionsmoleküle erfasst: Indian hedgehog (Ihh), Parathyroid Hormone related Peptide (PTHrP) mit dem PTH/PTHrP-Receptor (PTHR), Fibroblast Growth Factor (FGF), Transforming Growth Factor (TGF) und Matrix Metalloproteinase (MMP).

Es konnte gezeigt werden, dass Knochenschnitte nach PTE deutlich häufiger und signifikant intensiver angefärbt waren und somit eine Stimulation innerhalb der untersuchten Signaltransduktionskaskaden stattfand. Mittels Scorings wurde erfasst, mit welcher Intensität die erwähnten Wachstumsfaktoren in den diversen Zonen der Epiphysenfuge und im Perichondrium über die Zeit exprimiert wurden. Auffällig war der meist ondulierende Konzentrationsverlauf der Signalmoleküle, welcher insbesondere auf den negativ Feedback-Loop von Ihh/PTHrP/PTHR zurückzuführen ist. So wird der wachstumsfördernde Faktor Ihh vor allem 2 Tage und 18-21 Tage nach der Operation exprimiert während die das Wachstum hemmenden Faktoren PTHrP und PTHR vermehrt gegen Ende der Untersuchungsperiode auf der operierten Seite erscheinen.

Histomorphometrische Messungen ergaben signifikant negative Korrelationen zwischen den einzelnen Abschnitten der Wachstumsfuge, was ebenfalls den negativen Feedback-Loop bestätigt.

Summary

The aim of this study was to examine the effects of „periosteal stripping“ (Periosteal Transection and Elevation“ (PTE), by means of immunohistochemical techniques, on the growth factors of a juvenile growth plate (GP). PTE is a standard treatment for foals with angular limb deformities (ALD), which is a common orthopedic problem in foals and consists in axis deviations in the front or hind limbs. This study is based on an animal model with 6 groups of 2 lambs, which unilaterally underwent surgery, applied on 4 sites (radius, tibia, metacarpus III, metatarsus III). Because the mechanisms that determine bone growth at the level of the GP are elementary, it can be assumed that the study results can also be applied on horses. At time intervals of 2, 6, 10, 14, 18 and 21 days after surgery, two lambs were sacrificed and processed for histological evaluation of the bone material. The samples, taken at four different localisations per sheep, were morphologically and immunohistochemically reviewed, then histomorphometry was applied in a follow-up study. The following growth-associated molecules were part of the immunohistochemical analysis: Indian hedgehog (Ihh), Parathyroid Hormone related Peptide (PTHrP) with its PTH/PTHrP-Receptor (PTHR), Fibroblast Growth Factor (FGF), Transforming Growth Factor (TGF) and Matrix Metalloproteinase (MMP). After the morphological examination, a semiquantitative scoring of color change and staining intensity was done. It was shown, that bone samples were significantly more frequently and intensely stained after stimulation through PTE. The results indicate an undulating pattern of staining intensity, which is most probably due to the negative feedback loop of Ihh/PTHrP/PTHR. This hypothesis could be additionally corroborated with the fact, that histomorphometric measurements revealed significant negative correlations between the various sections of the GP.

1 Einleitung

1.1 Angular Limb Deformity ALD

1.1.1 Problem

Bei der „Angular Limb Deformity“ (ALD) handelt es sich um ein relativ häufiges orthopädisches Problem bei Fohlen. Dieses manifestiert sich in Achsenabweichungen der Vorder- oder Hintergliedmassen. Das Resultat sind Varus- (Achsenabweichung nach medial distal des betroffenen Knochen/Gelenks) und Valgusfehlstellungen (Achsenabweichung nach lateral distal des betroffenen Knochen/Gelenks). In der Regel liegt der Ursprung des Problems im gestörten und somit asymmetrischen Knochenlängenwachstum auf der Ebene der Epiphysenfuge. Bis zur endgültigen Verknöcherung und Abschluss des Längenwachstums bietet die Wachstumsfuge aber auch Ansatzpunkte für korrektive Massnahmen.

Als chirurgische Interventionen bei einer manifesten ALD haben sich beim Jungtier mit noch aktiven Wachstumsfugen zwei Therapieansätze etabliert, die oft auch kombiniert angewandt werden: Wachstumsretardation mittels „Temporary Transphyseal Bridging“ (TTB) und Wachstumsacceleration durch Periosteal Stripping, auch „Periosteal Transection and Elevation“ (PTE) genannt. Es hat sich gezeigt, dass durch Inzision und Anheben des Periostes am metaphysischen Aspekt der das geringere Längenwachstum aufweisenden Wachstumsfuge eine (Re-) Aktivierung der enchondralen Ossifikation und somit des Knochenlängenwachstums erreicht werden kann. In der Humanmedizin ist ein ähnliches Phänomen unter dem Begriff „catch-up growth“ bekannt (Bakker, van der Eerden et al. 2003); hierbei zeigten Patienten mit wachstumshemmenden Erkrankungen wie Cushing, Hypothyreose, Anorexia nervosa, Mangelernährung oder Frakturen des Femurschaftes nach Therapie eine „Reaktivierung der Wachstumsfuge“ und ein kompensatorisches Längenwachstum (Wessel and Seyfriedt 1996; Beck, Kinzl et al. 2001).

Diverse Studien an Fohlen haben ergeben, dass bei rechtzeitiger Diagnose und Therapie bei einem grossen Prozentsatz mit vollständiger Korrektur der Achsenabweichung gerechnet werden darf (Bertone, Park et al. 1985; Bertone, Turner et al. 1985).

1.1.2 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Studie bestand darin, auf molekularbiologischer Ebene die durch PTE tangierten Mechanismen in der Wachstumsfuge (Growth Plate: GP) zu untersuchen. Denn

obwohl die PTE seit geraumer Zeit eine breite Akzeptanz genießt und vielerorts angewandt wird, wurde kürzlich deren Wirksamkeit durch eine Studie (Read, Read et al. 2002) in Frage gestellt. Da die molekularen Mechanismen, welche zur Aktivierung oder Hemmung der GP führen, bisher kaum erforscht wurden, lag das Hauptaugenmerk dieser Studie auf der parakrinen und autokrinen Faktorregulation, der Wachstumsfuge und dem anliegenden Perichondrium. Anhand eines Grosstiermodells und mittels immunhistochemischer Techniken sollte dokumentiert werden, wie anhand des chirurgischen Eingriffs PTE spezifisch gewisse Signalfaktoren und damit verbundene Signalkaskaden induziert oder gehemmt werden und somit die Chondrocytendifferenzierung reguliert wird.

2 Literatur

2.1 Definition ALD

Bei „Angular Limb Deformities (ALD)“ handelt es sich um eine Achsenabweichung der Gliedmasse, resultierend in einer Varus- oder Valgusfehlstellung. Fohlen mit ALD weisen Deformationen der Vorder- und/oder Hintergliedmassen auf, entstanden durch ungleichmässiges Wachstum auf der Ebene der epiphysalen Wachstumsfugen. Am häufigsten von Varus- bzw. Valgusfehlstellungen betroffen ist das Carpalgelenk, gefolgt vom Fesselgelenk und vom Tarsus (Adams 2000). Der tangierte Knochenabschnitt liegt im Normalfall im Bereich der Metaphyse, und äusserst selten in der Diaphyse (Auer and Stick 2006). Neben Achsenabweichungen in der Senkrechten weisen die Mehrheit der betroffenen Fohlen geringgradige Rotationsabweichungen auf, die zu einwärts- bzw. auswärtsgerichteten Hufen führen (Adams 2000). Die bei Fohlen am häufigsten auftretende ALD, eine carpale Valgusfehlstellung, ist regelmässig mit einer Auswärtsrotation assoziiert; Innenrotationen werden meist zusammen mit Varusfehlstellungen beobachtet (Auer and Stick 2006).



Abb. 2.1. Fohlen mit Angular Limb Deformity (Photo: Prof. J.A. Auer)

2.2 Ätiologie

Die Ätiologie von ALD kann prae-, peri- oder postnataler Natur sein (Auer and Stick 2006). Auslöser für die Gliedmassenasymmetrien sind vor allem übermässige und unausgewogene Kräfte, welche während der Gestation oder später beim jungen Fohlen auf die GP einwirken und dort zu einer verzögerten, asynchronen Umwandlung der Knorpelzellen in Knochengewebe führen. Die dadurch unphysiologisch verbreiterte und relativ weiche GP reagiert auf exzessiven Druck mit Nekrose, wird im Wachstum gehemmt oder schliesst sich gänzlich. Somit können jegliche Faktoren, die eine asymmetrische Belastung der dysmaturen Knochenstrukturen zur Folge haben, potentiell eine ALD herbeiführen (Adams).

Bereits während der Trächtigkeit kann es auf Grund von intrauteriner Weichteiltraumata, Laxizität der periartikulären Strukturen, Placentitis, anhaltenden metabolischen Erkrankungen, Zwillingsfrühgeburt, Strahlenbelastung etc. zu instabilen Gelenken oder mangelhafter Ossifikation von Carpus oder Tarsus kommen (Bakker, van der Eerden et al. 2003), (Pateder, Eliseev et al. 2001). Nicht selten sind „physiologische“ Fehlstellungen kurz nach der Geburt des Fohlens aber allein haltungsbedingt, verursacht durch eine noch unterentwickelte Bemuskulung des Bewegungsapparates. Zudem sind neugeborene Fohlen noch sehr schwach und der Thorax schmal. Zwecks Ausbalancieren des Rumpfes auf den verhältnismässig langen Beinen zeigen Fohlen oft eine vorübergehende Innen- oder Aussenrotation der Gliedmassen (Bramlage LR 2006). Problematisch wird es bei ungenügender Ossifikation sowie manifester Gelenkslaxizität. Dann führt ungleichmässige Druckverteilung auf die noch relativ dicken und weichen Knorpelplatzhalterstrukturen zu - wie im ersten Abschnitt beschriebenen - asymmetrischem Knochenlängenwachstum, woraus sich während der postnatalen Maturation sukzessive eine ALD etablieren kann. In schwerwiegenden Fällen können bei dysmaturen Fohlen Luxationen, Frakturen oder sogar Kollabieren der Ossa cuboidei als Folge auftreten.

Abgesehen davon, dass die ALD eine mechanisch bedingte Gang- und Haltungsstörung verursachen kann, führt sie unumgänglich zu einer unausgewogenen Belastung der Gelenksknorpel der distal gelegenen Gelenke. Über längere Zeit kann die unphysiologische Druckverteilung auf (und in) den Gelenken in einer Osteoarthritis und Gelenksdegenerationen resultieren – bereits in jungem Alter. Zudem reagiert eine von ALD betroffene Gliedmasse nicht selten mit einer zusätzlichen, sog. kompensatorischen ALD weiter distal, verursacht durch die ungleichmässige Belastung durch die proximal gelegene Achsenabweichung

(Bramlage LR 2006). Dem ungeübten Betrachter erscheint die Extremität dann gerade, obwohl die betroffenen Gelenke nicht in einer Achse stehen. Je nach Schweregrad zeigen die Fohlen in der Bewegung ein leicht schlingerndes Vorführen der betroffenen Beine.

Postnatal können externe Traumata mit Einwirkung auf die noch unverknöcherte GP, unausgewogene Fütterung oder Überanspruchung des im Wachstum befindlichen Skeletts zu asymmetrischem Knochenlängenwachstum führen (Auer and Stick 2006). Tiere mit congenitaler ALD haben typischerweise normale Diaphysen, während solche mit erworbener ALD oft pathologische Veränderungen im Bereich der Diaphysen aufweisen (Adams 2002).

Abschliessend dürfen folgende Ursachen als die zur Zeit wichtigsten in der Entwicklung einer ALD betrachtet werden: Unreife cuboidale Knochen, Laxizität der periartikulären Strukturen und, bedingt durch die genannten zwei Gründe oder unabhängig davon, ungleichmässiges Längenwachstum auf der Ebene der Wachstumsfuge.

2.3 Therapie

2.3.1 Konservative Therapieformen

Die erste Massnahme bei Fohlen mit inadäquater Ossifikation, Laxizität der periartikulären Strukturen oder Hinweisen auf eine manifeste oder sich möglicherweise etablierende ALD ist Restriktion der Bewegungsfreiheit durch Boxenruhe mit dem Ziel, das Risiko gestörter Ossifikation und/oder die Entwicklung einer Osteoarthritis möglichst gering zu halten. Bei Patienten mit Unreife der cuboidalen Knochen ist das Anbringen von Splints oder Casts angezeigt. Damit wird dem Tier die Chance gegeben, den Knochenentwicklungsrückstand unter bestmöglichen Bedingungen nachzuholen, während gleichzeitig die Gliedmasse in der Achse stabilisiert und entlastet wird. Als ergänzende Massnahme kann durch eine Hufkorrektur, zum Ausbalancieren der auf die Gliedmasse wirkenden Kräfte, eine positive Wirkung erzielt werden. Die Hufkorrektur sollte aber nie als (alleinige) therapeutische Massnahme angewandt werden (Adams 2002). Kontraindiziert sind signifikante Hufkorrekturen besonders bei älteren Fohlen und schwerwiegender ALD, da die erzwungene Huf- und Beinhaltung abnormale Torsionskräfte hervorbringt und verfrühte degenerative Prozesse in den Gelenken einleiten kann (Auer and Stick 2006).

2.3.2 Chirurgische Therapieformen

Chirurgische Interventionen haben zum Ziel, Wachstumsungleichheiten entweder durch Wachstumsbeschleunigung (Growth Acceleration) oder Wachstumshemmung (Growth

Retardation) zu egalisieren. Durch die betroffene Physisenfuge überbrückende Implantate wie Schrauben, Platten bzw. Cerclagen, welche auf der konvexen Knochenseite angebracht werden, wird das Wachstum auf dieser Seite durch „Temporary Transphyseal Bridging“ (TTB) solange gehemmt, bis die Gliedmassen wieder gerade sind oder das Knochenlängenwachstum abgeschlossen ist (Adkins 2006) (Gladbach, Pfeil et al. 2000), (Ogilvie and King 1990). Dabei entstehen in der GP, nach Anbringen der Implantate, wegen der fortschreitenden enchondralen Ossifikation Druckkräfte, die die Vaskularisation hemmen und somit auch die Osteogenese eindämmen. Auf gegenteiligem Prinzip beruht die PTE (Periosteal Transection and Elevation), bei welcher auf der konkaven Knochenseite proximal der GP die Knochenhaut inzidiert und angehoben wird. Die Wirkung dieser Methode beruht einerseits auf der mechanischen Entlastung der Wachstumszone (Adams 2000), welche durch das Periost begrenzt und somit wahrscheinlich auch in der Form und im Wachstum gesteuert und limitiert wird; andererseits wurden in früheren (van der Eerden et al. 2003) und dieser Studie die Einflussnahme komplexer molekularbiologischen Mechanismen wie Wachstumsinduktion durch lokale Signalkaskaden untersucht.

Verschiedene experimentelle (Auer and Martens 1982) sowie klinische Studien (Bertone, Park et al. 1985; Bertone, Turner et al. 1985) haben gezeigt, dass durch die HCPTE (Hemicircumferential Periosteal Transection and Elevation) für die Dauer von etwa 2 Monaten ein positiver wachstumsfördernder Effekt auf der ipsilateralen Knochenseite erreicht werden kann (Auer and Stick 2006). Je früher die Operation durchgeführt wird, desto schneller und effektiver die Korrektur. Allgemein gilt die Regel, dass chirurgisch interveniert werden sollte, sobald bei neonatalen Fohlen eine ALD des Carpus oder Tarsus nicht manuell korrigiert werden kann – also nicht auf periartikulärer Laxizität beruht - und 2-3 Wochen Stallruhe keine Verbesserung bringen, es sich um eine schwere Achsenabweichung $>10^\circ$ oder gar eine fortschreitende ALD handelt. Da der Effekt sowohl einer TTB wie auch einer PTE von einer noch aktiven, Längenwachstum-aufweisenden Wachstumsfuge abhängt, richtet sich das Zeitfenster für diese Operationen nach dem Schluss der betroffenen Wachstumsfuge.

Nach Abschluss des Knochenlängenwachstums bleiben nur noch wesentlich invasivere Massnahmen wie die korrektive Osteotomie oder Ostektomie als Therapiemöglichkeiten. Bei der Stufenosteotomie in der sagittalen Ebene wird ein Knochenspickel im Zentrum der Diaphyse entfernt, bei der Stufenosteotomie in der frontalen Ebene werden die zwei Knochenstücke nach einer Z-förmigen Osteotomie gegeneinander verschoben, bis die Längsachse korrekt ist. Eine weitere Möglichkeit stellt die „Closing Wedge Osteotomy“ dar, bei welcher ein Knochenkeil in der Horizontalebene entfernt wird, um die Längsachse zu

korrigieren. Die Stufenosteotomie hat gegenüber der „Closing Wedge Osteotomy“ den Vorteil, dass post operativ die Knochengesamtlänge erhalten bleibt. Im Falle einer zusätzlichen rotations-bedingten Achsenabweichung, kann diese durch Kombination einer Stufenosteotomie und das Heraussägen eines weiteren Knochenkeils in der Sagittalebene behoben werden. Hierzu werden die Schnittflächen in einer zusätzlichen Ebene gegeneinander verschoben. Danach müssen die Knochenstücke mittels Cortexschrauben und Knochenplatten gut in der richtigen Position fixiert werden. Allfällig entstandene Hohlräume können mit Knochenimplantat aufgefüllt werden (Auer and Stick 2006). Abgesehen davon, dass diese invasiven Methoden viel aufwändiger sind, ist aufgrund der erheblichen Komplikationsmöglichkeiten mit einer vorsichtigeren Prognose zu rechnen.

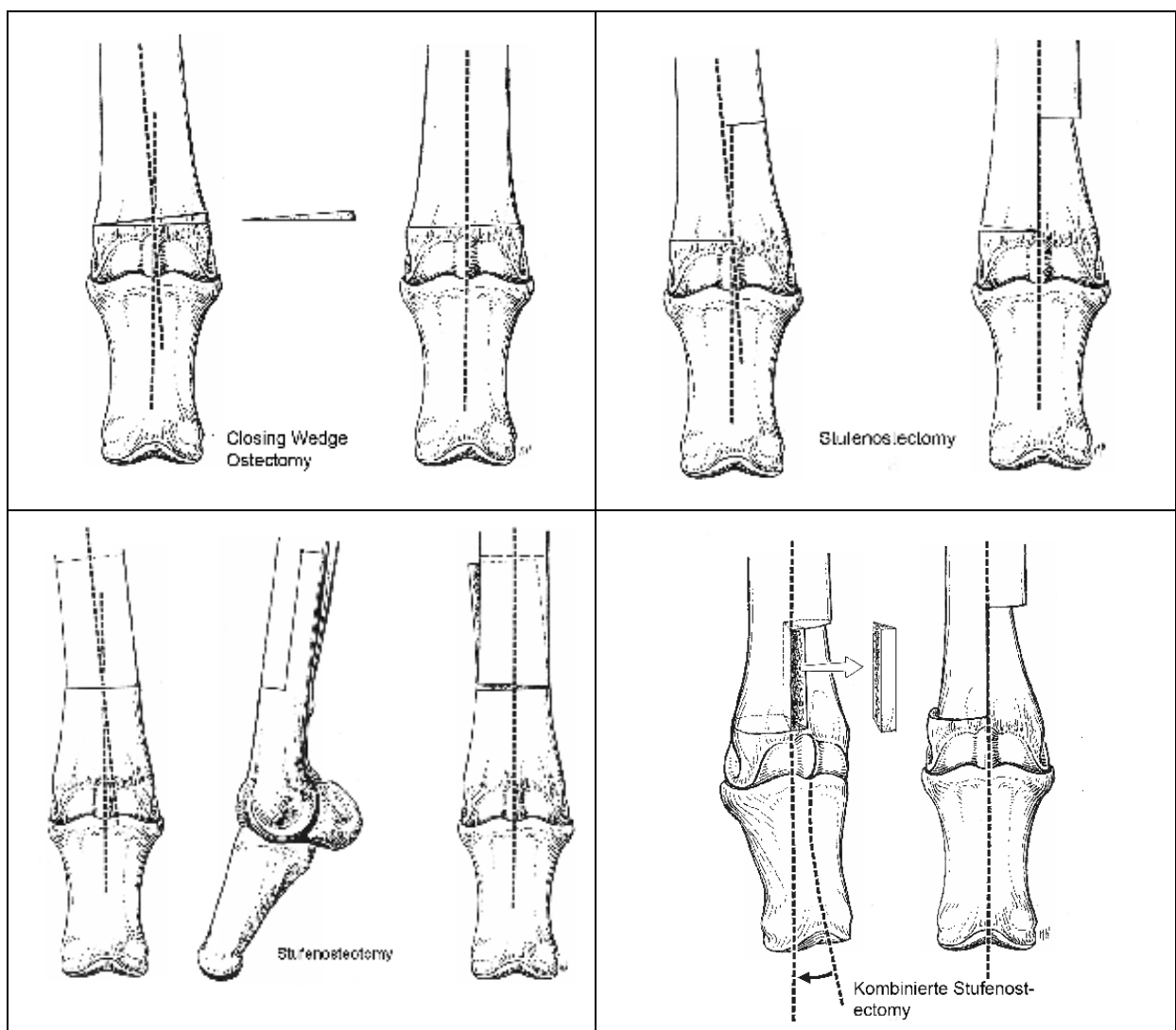


Abb. 2.2 Korrektive Osteotomien und Ostektomien (Illustrationen M. Haab)

2.3.3 Knochenentwicklung

Bei sog. höheren Wirbeltieren gibt es zwei mögliche Wege der embryonalen Knochenentwicklung: Die desmale und die enchondrale Ossifikation (Samuelson 2007). Die desmale Ossifikation durchlaufen Schädelknochen und Teile der Gesichtsknochen, wobei mesenchymale Vorläuferzellen sich direkt zu Knochenmatrix produzierenden Osteoblasten differenzieren. Die Knochen des Bewegungsapparates sowie die meisten Gesichtsknochen werden dagegen durch enchondrale Ossifikation gebildet (Provot and Schipani 2005). Diese erfolgt in mehreren Schritten, wobei als erster Zwischenschritt (die Knochenanlage in Form von) Knorpelgewebe angelegt wird, welches in einer späteren Phase ossifiziert und durch Knochengewebe ersetzt wird. Postnatal ist das Dicken- und Längenwachstum des ossären Stützgewebes noch nicht abgeschlossen. Zwischen den Epiphysen, welche von hyalinem Gelenkknorpel überzogen werden, und der Diaphyse befindet sich die bis zum Ende der Pubertät knorpelige Wachstumsfuge, die GP. Bis zur endgültigen Verknöcherung der Epiphysenfuge zeichnet sich diese als Ort des Knochenlängenwachstums durch ständige enchondrale Ossifikation aus. Entsprechend findet gleichzeitig das vom Periost ausgehende Dickenwachstum statt.

Die GP lässt sich auf Grund morphologischer und funktioneller Aspekte in vier Zonen unterteilen: Die erste von der Epiphyse aus betrachtet differenzierbare Zellschicht ist die **Reservezone**, welche mit ihren Chondrocytenvorläuferzellen (Stammzellen) Nachschub für die nachfolgenden Zonen liefert.

In der zweiten Zone, der **Proliferationszone**, finden sich Zellen von erhöhter Zellaktivität, welche sich kontinuierlich unidirektional replizieren. Durch die Synchronizität und den hohen Turn-over dieses Vorgangs, infolge dessen sich die Zellen dicht gefolgt isogen aneinanderreihen, kommt es zur sog. Säulenknorpelbildung. Diese proliferierenden und reifenden Chondrocyten produzieren Typ II Kollagen und flachen durch den Druck der nachschiebenden Knorpelzellen allmählich ab.

In der nachfolgenden **hypertrophen Zone** kommt es zu einer deutlichen Volumenvermehrung durch Glycogeneinlagerung und Wasseraufnahme, was entscheidend zum Längenwachstum beiträgt. Dabei produzieren die Zellen Kollagen Typ X, wobei die Extrazellulärmatrix eine deutliche Mineralisierung erfährt. Zudem wird der Faktor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) produziert, der Gefäße in der anschliessenden Eröffnungszone zur Bildung von Migrationsfortsätzen animiert.

Eine kontrollierte Apoptose führt zum Absterben der Zellen und zur Bildung von Lacunae, weshalb von der **Eröffnungszone** gesprochen wird. Blutgefäße sprossen ein und bilden den Transportweg für Osteoblasten, die damit beginnen, Knochenmatrix zu synthetisieren. Dazu muss die Knorpelmatrix zuerst durch Chondroklasten, einem Subtyp der Osteoklasten, abgebaut werden (Wenzel 2003). Osteoblasten nehmen sich die extrazelluläre Matrix zum Gerüst für die weitere Osteogenese, bzw. die Bildung der primären Spongiosa (Samuelson).

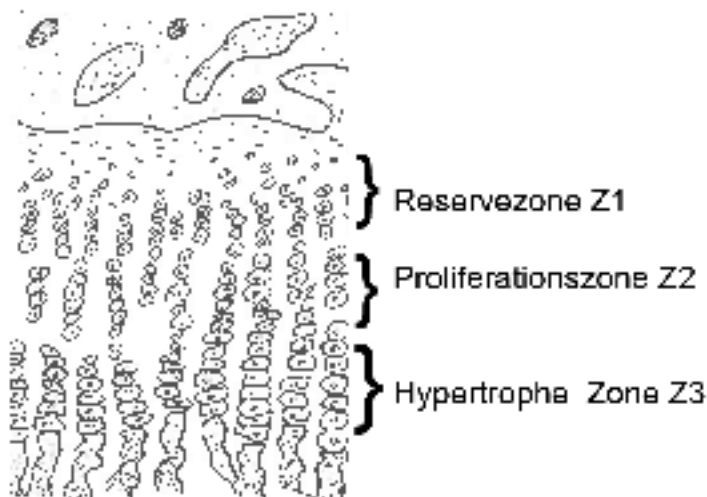


Abb. 2.3 Histologischer Aufbau der Epiphysenfuge (Graphik S. Tanner)

2.4 Molekularbiologische Mechanismen

Die genauen Vorgänge der (enchondralen) Ossifikation auf Molekularebene sind zur Zeit Arbeitsgegenstand verschiedener Forschungsgruppen. Bekannt ist, dass ein hochkomplexes Netzwerk von Signalstoffen für die Differenzierungsschritte der Osteogenese verantwortlich ist (van der Eerden, Karperien et al. 2000). Neben systemischen und lokalen Steuerungsmechanismen durch endokrine Hormone und Zytokine sind die direkt interagierenden Signalmoleküle „Indian hedgehog“ (Ihh) und „Parathyroid Hormone related Peptide“ (PTHrP) mit dem entsprechenden PTH/PTHrP-Receptor 1 (Juppner 1995; Chung, Lanske et al. 1998; Kronenberg, Lanske et al. 1998; van der Eerden, Karperien et al. 2000; Chung, Schipani et al. 2001; Huch, Kleffner et al. 2003; Tiet and Alman 2003) von zentraler Bedeutung (Juppner 2000). Ihh wird von den Chondrozyten exprimiert, welche die hypertrophe Differenzierung durchlaufen. Via die Moleküle Patched 1 (Pct1) (Alvarez, Horton et al. 2001; Alvarez, Sohn et al. 2002) Gli (Vortkamp, Lee et al. 1996; Semevolos, Strassheim et al. 2005) und Smoothed (Smo) (Juppner 2000; van der Eerden, Karperien et

al. 2000) durch praehypertrophe und hypertrophe Chondrocyten (Chung, Lanske et al. 1998; Chung, Schipani et al. 2001; Kronenberg and Chung 2001) synthetisiert, regulieren diese auf direktem Wege die Chondrocytendifferenzierung. Zusammen mit PTHrP (Segre and Lee 2001), welches von proliferierenden, frühen hypertrophen Knorpelzellen und im periartikulären Perichondrium exprimiert wird, steuert Ihh das Einsetzen der hypertrophen Differenzierung mittels eines negativen Feedbackmechanismus' (van der Eerden, Karperien et al. 2000; Chung, Schipani et al. 2001; Kronenberg and Chung 2001; van der Eerden, Karperien et al. 2003).

In einem ersten Schritt wird das von den praehypertrophen Chondrocyten exprimierte Ihh freigesetzt, welches die proportional abhängige PTHrP-Synthese in den periartikulären Zellen induziert. Sobald die praehypertrophen Knorpelzellen einen bestimmten Grad der Differenzierung erreicht haben, wird die Ihh-Freisetzung gehemmt. Dies führt zu einer reduzierten Expression von PTHrP und in der Folge zum erneuten Einsetzen der Chondrocytendifferenzierung (Vortkamp 2003; Wenzel 2003). Abgesehen vom regulatorischen Effekt von Ihh im Zusammenspiel mit PTHrP, beeinflusst Ihh nachweislich die Rekrutierung und Differenzierung von Osteoblasten aus dem Perichondrium. (Colnot, Lu et al. 2004).

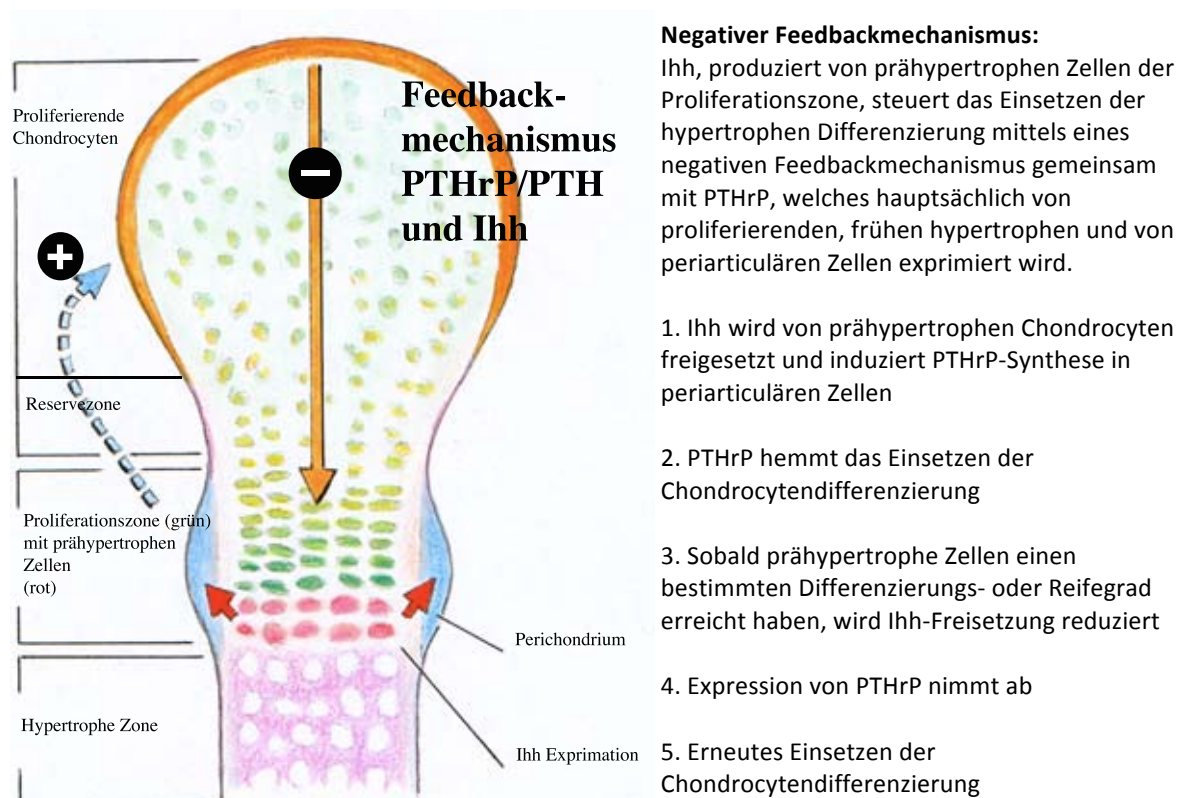


Abb. 2.4. Feedbackloop Ihh <-> PTHrP/PTH (Graphik nach Prof. B. von Rechenberg)

Da Ihh und PTHrP von Zellen in unterschiedlichen Stadien und räumlich zum Teil nicht direkt nebeneinander liegend exprimiert werden, die Diffusion durch die extrazelluläre Matrix (ECM) zudem limitiert ist, muss davon ausgegangen werden, dass weitere Faktoren und Moleküle am komplexen Mechanismus des Knochenwachstums, d.h. der Differenzierung und Ossifikation, beteiligt sein müssen. Neben dem Ihh/PTHrP-System werden zum Beispiel den „Bone Morphogenetic Proteins“ (BMPs) (van der Eerden, Karperien et al. 2000; Chung, Schipani et al. 2001) und den „Fibroblast Growth Factors“ (FGFs) (Huch, Kleffner et al. 2003) nicht unwesentliche Bedeutung beigemessen. Wie Ihh und PTHrP haben die beiden Signalstoffe antagonisierende Wirkung: Während die hypertrophe Differenzierung durch BMP-Freisetzung verzögert wird, üben FGF-Signale eine beschleunigende Wirkung aus. Dies geschieht indirekt, über ein Hoch- bzw. Herunterregulieren der Ihh-Expression. Unabhängig vom Ihh/PTHrP-Signalkreislauf hemmt BMP den Differenzierungsprozess, während FGF diesen aktiviert (Vortkamp 2003). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass bei Eintritt ins hypertrophe Stadium zusätzlich Proteine aus der Familie der „Transforming Growth Factors“ (TGF) signifikant ansteigen (Serra, Karaplis et al. 1999; Alvarez, Sohn et al. 2002). Dabei wurde $TGF_{\beta 2}$ besonders in der Proliferations- und hypertrophen Zone nachgewiesen, während $TGF_{\beta 1}$ nur in der hypertrophen Zone auftrat und die Expression von PTHrP in der proliferativen Zone stimulieren soll (Alvarez, Horton et al. 2001; Alvarez, Sohn et al. 2002).

Abschliessend exprimieren vollausdifferenzierte Chondrocyten Osteopontin und Matrix Metalloproteinase (MMP)-13, bevor die Zellen in die Apoptose übergehen (Yoon, Pogue et al. 2006). Zeitgleich synthetisieren hypertrophe Chondrocyten die ECM, welche die Knochenmineralisation und die Blutgefässinvasion begünstigt. Die Gefässeinsprossung wird massgebend durch den VEGF stimuliert.

3 Material und Methoden

3.1 Ablauf der Studie

12 Lämmer im Alter von 2.5-3 Monaten der Rasse Weisses Alpenschaf dienten dieser Arbeit als Studienobjekte. Für die Hauptstudie wurden die Tiere in 6 Zweiergruppen unterteilt. Alle wurden unilateral medial operiert und zwar distal an Radius, Tibia, Metacarpus III und Metatarsus III, wobei die nicht-operierte Gliedmasse später jeweils als Kontrolle dienen sollte. Jedes Tier erfuhr folglich an vier verschiedenen Lokalisationen eine PTE. Im Abstand von 2, 6, 10, 14, 18, und 21 Tagen wurde jeweils ein Studienpaar geschlachtet und Knochenmaterial zur späteren mikroskopischen Beurteilung entnommen.

Schaf Nummer	Schlachttag (d)	OP-Seite	Kontrollseite
2701	2	links	rechts
2702	2	rechts	links
2709	6	links	rechts
2710	6	rechts	links
2703	10	links	rechts
2704	10	rechts	links
2705	14	links	rechts
2706	14	rechts	links
2711	18	links	rechts
2712	18	rechts	links
2707	21	links	rechts
2708	21	rechts	links

Abb. 3.1 Einteilung der Schafe in Versuchsgruppen

Zu einem späteren Zeitpunkt wurden im Rahmen einer Folgestudie („Effekte des Periost-Stripping auf den Knochenstoffwechsel von Fohlen und Lämmern“ von R. Giezendanner) 10 weitere Schafe operiert. Diesmal wurden die Lämmer an denselben Lokalisationen wie in der Hauptstudie operiert, jedoch jeweils lateral und im Unterschied zur ersten Studie alle am Tag 22 post Operationem geschlachtet. Die histologischen Dünnschnitte wurden immunhistochemisch mit diversen Markern angefärbt und dann ebenfalls semiquantitativ beurteilt.

3.2 Schafvorbereitung

Nach Erteilung der Bewilligung für die Tierexperimente dieser Studie durch die kantonale Tierversuchskommission des Bundesamtes für Veterinärwesen und das Veterinäramt Zürich, konnten 12 Lämmer der institutseigenen, auf einem externen Hof eingestellten Schafherde

entnommen werden. Alle Lämmer waren männlich und - ausser eines – kastriert, hatten Zugang zu einer grossen Weide und wurden anlässlich der regelmässigen Klauenpflege der Herde allgemein auf ihren Gesundheitszustand kontrolliert. Beim Eintritt in die Studie waren die Lammböcke zwischen 2 Monate 16 Tage und 2 Monate 28 Tage alt; im Durchschnitt betrug das Alter 2 Monate 20 Tage. Eine Woche vor der Operation wurden die Tiere in einen näher gelegenen Stall transportiert und mit der obligatorischen TVD-Nummer im einen und der versuchsspezifischen Ohrmarke im anderen Ohr gekennzeichnet. Alle Lämmer wurden einer klinischen Untersuchung unterzogen. Des weiteren wurde den Lämmern 3 Tage prae Operationem Blut entnommen und ein Chemogramm und eine hämatologische Analyse angefertigt. 24 Stunden vor der OP wurden die Schafe gewogen, wobei das Leichteste 18 kg und das Schwerste 28 kg wog (Durchschnitt: 22.5 kg). Ausserdem wurden die Tiere im Halsbereich und, jeweils einseitig, das Vorder- und Hinterbein geschoren und danach in eine mit Sägespänen eingestreute Box umgestellt. Dort gab es Wasser ad libitum und Futter bis 12h vor der Operation.

3.3 Operation

Den Lämmern wurde prophylaktisch subcutan 1.5ml Tetanusserum injiziert und anschliessend mit Medetomidin i.m. (10µg; Domitor®; Dr. E. Gräub AG, Bern, Schweiz) sedativ prämediziert. Etwa eine halbe Stunde später wurden die Tiere in den Operationsraum verbracht. Dort wurde der freigeschorene Hals mit Seife gewaschen und mit Chlorhexidin (Hibitane® Tinktur; SSL Healthcare Schweiz AG, Reinach, Schweiz) und Alkohol desinfiziert. In die Vena jugularis wurde, unter sterilen Kautelen, ein Venenverweilkatheter (Vygonüle S® G14; Vygon GmbH; Aachen, Deutschland) gelegt, der mit einem IN-Stopper (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) als Verschlussvorrichtung kombiniert wurde. Im Anschluss erhielten die Tiere eine präoperative Antibiose bestehend aus Benzylpenicillin i.v. (30'000 I.U./kg; Penicillin „Grünenthal 10 Mega“; Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) und Gentamycin i.v. (6 mg/kg; G. Streuli AG; Uznach, Schweiz). Zudem bekamen die Schafe 1000 I.E. equines Tetanusantoxin s.c. (Tetanusserum Intervet; Vertrieb Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) verabreicht. Die Cornea wurde mit einer epithelschützenden Augensalbe (Vitamin A Dispersa®; Novartis AG, Bale, Schweiz) vor Austrocknung geschützt und zur perioperativen Analgesie Buprenorphin i.v. (0.03 mg/kg; Temgesic®, Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) injiziert. Das Operationsgebiet, pro Versuchspaar distale Tibia, distaler Radius, Metacarpus III und Metatarsus III je einmal linksseitig, einmal rechtsseitig, wurde standardmässig aseptisch vorbereitet (Auer and Stick 2006). Die Narkose wurde mit

Ketaminhydrochlorid i.v. (2 mg/kg; Narketan® 10%, Vetoquinol AG, Belp-Bern, Schweiz) und Diazepam i.v. (0.1 mg/kg; Valium®, Roche Pharma AG, Reichach, Schweiz) eingeleitet. Bei Bedarf wurden zur Intubation zusätzlich 2-4 mg/kg i.v. Propofol gegeben. Die Tiere wurden mit Endotrachealtuben der Grösse 7 intubiert, nachdem der Kehlkopf mit einem Sprühstoss Lidocain (entspricht 10 mg; Xylocain® Spray, Astra Pharmaceutica AG, Dietikon, Schweiz) lokal betäubt worden war. Die Anästhesie wurde mit 1-1,5% Isofluran (Forene®; Abbott AG, Baar, Schweiz) und O₂ in Form einer Inhalationsnarkose aufrechterhalten.

Initial wurde an je zu operierender Lokalisation ein 3 cm langer medialer Hautschnitt in der Längsachse der Extremität knapp proximal der jeweiligen Epiphysenfuge mit einer Skalpellklinge Nr. 21 durchgeführt. Um das Periost zu erreichen, wurden mit einer gebogenen Halstead-Mosquito-Klemme Subcutis und Sehnen parallel zur GP beiseite geschoben. Im Schutze der auf dem Periost abgestützten und gleichzeitig abduzierten, leicht gespreizten Klemme wurde ein Skalpell Nr. 12 cranial angesetzt und das Periost - parallel zur knapp distal gelegenen GP - zum dorsalen/kranialen sowie palmaren/caudalen Aspekt hin horizontal inzidiert. Anschliessend wurde das Periost vertikal, entsprechend des Hautschnitts, auf einer Länge von ca. 3 cm nach proximal durchtrennt. Die resultierende Inzision entsprach einem umgekehrten T. Dabei entstanden zwei triangelförmigen Periostlappen, welche mit einem Periostelevator angehoben und sogleich wieder vorsichtig auf den Knochen zurückgelegt wurden. Die Subcutis wurde durch eine einfache, fortlaufende Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial (Polygalactin, Vicryl® 2/0; Johnson&Johnson Intl., Brüssel, Belgium) vernäht. Die Haut wurde mit Metallstapels (Davis+Geck Appose ULC®; Vertrieb B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) adaptiert.

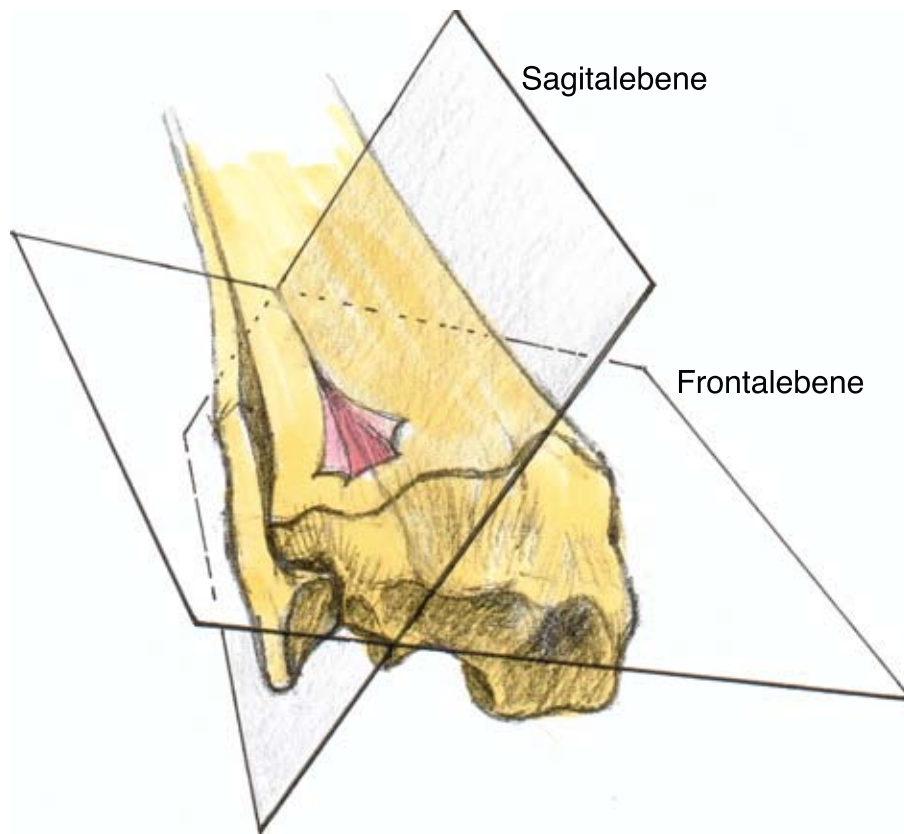


Abb. 3.2 Schematische Darstellung PTE/Periosteal Stripping (Illustration M. Haab)

Um die Wunden zu schützen wurden am Schluss die operierten Vorder- und Hintergliedmassen mit einem leichten Verband einbandagiert. Nach Extubation und Erwachen aus der Narkose wurden die Lämmer in Einzelboxen, welche mit Stroh eingestreut waren, verbracht. Dort erhielten sie Heu und Wasser ad libitum. Statt eines nicht-steroidalen Antiphlogistikums (NSAIA), welches die Signaltransduktion der später gesuchten Moleküle hätte beeinflussen können, erhielten die Tiere zur postoperativen Analgesie bei Bedarf nach 4-6 Stunden Buprenorphin i.v. (0.03 mg/kg, Temgesic®, Essex Chemie AG, Lucerne, Switzerland) verabreicht. Eine prophylaktische postoperative Antibiose erfolgte durch eine dreimalige Injektion von Amoxicillin s.c. (7 mg/kg einmal täglich; Clamoxyl®, Pfizer AG, Zurich, Switzerland). Die Lämmer wurden post Operationem 3 Mal täglich bezüglich ihres Allgemeinzustandes, die Wunden morgens und abends auf Anzeichen von Schwellung kontrolliert. Nachdem sich die Tiere von der Operation erholt hatten, wurden sie in Gruppenboxen verbracht, wo sie bis zum Schlachtzeitpunkt gehalten wurden.

3.4 Probengewinnung

In Intervallen von 2, 6, 10, 14, 18 und 21 Tagen bzw. am Tag 22 (Folgestudie) wurden die Studienpaare für die Probengewinnung geschlachtet. Nach der Elektrobetäubung wurden sie entblutet und gehäutet. Beidseits wurden Radius, Tibia sowie vorderes und hinteres Röhrein abgetrennt und freipräpariert; im Rahmen der Folgestudie geschah dies nur unilateral da die zweite Hälfte der Versuchsgruppe nicht operiert wurde und somit als Kontrolle diente. Mit der Bandsäge wurden die distalen Knochenteile, in der sagittalen Ebene in circa 1mm dicke, durch die GP verlaufende, Longitudinalscheiben gesägt. Die Knochen der am Tag 22 geschlachteten Schafe wurden zum Vergleich in der Frontalebene, d.h. von lateral nach medial gesägt. Nach sorgfältigem Ablösen der Knochenscheiben wurden diese in 4% Paraformaldehyd (Fluka 76240, Buchs SG, Schweiz) fixiert. Die Knochenschnitte wurden fortlaufend von medial nach lateral durchnummeriert und abwechslungsweise zum Paraffinschnitt oder zur Kryokonservierung vorbereitet, wobei sowohl der medialste wie auch der lateralste Schnitt immer in Paraffin eingebettet wurde. Die Kryoschnitte wurden in dieser Studie nicht weiterverarbeitet. Der Knochenschnitt in der Mitte der Schnittreihe, das heisst, derjenige, welcher dem Zentrum des Röhrenknochens entstammt, wurde zwecks Übersicht speziell markiert. Dann wurden die Schnitte in dafür vorgesehene und beschriftete Röhrchen verbracht. Die Knochenscheiben wurden vorerst 2 Tage im Paraformaldehyd belassen, dann zum Entkalken in EDTA (Ethylendiamin Tetraessigsäure Dinatriumsalz 12%, pH 7, Fluka, Art. 03685, Buchs St. Gallen, Schweiz,) eingelegt welches regelmässig gewechselt wurde, bis der Knochen entkalkt und schneidbar war und schlussendlich in Paraffin eingebettet werden konnte.

3.5 Probenaufbereitung

Die 2-3 μ m dicken ungefärbten Knochenschnitte wurden auf positiv geladene Objektträger (SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und wie folgt für die Immunhistologie weiter verarbeitet: Mittels Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte entparaffiniert. Nach einer ca. 5 minütigen Wässerung und Gegenfärbung in Hemalaun für 3-4 Minuten, folgte bei Bedarf eine Vorbehandlung, damit die Epitope für die Antikörper freilagen und somit erreichbar waren. Dies geschah bei R (Rabbit) anti Human MMP (Matrix Metalloproteinase)-13 und M (Mouse) anti PTHR (Parathyroid Hormone Receptor) Type 1 in der Mikrowelle mit Citratpuffer pH 6.0 (Dako REAL™ Target Retrieval Solution (10x), Art. S2031), für zweimal 10 Minuten bei 750 Watt. Bei den Schnitten, welche nachher mit dem R (Rabbit) anti PTHrP (Parathyroid Hormone related

Protein; H 137) Antikörper, dem R anti Ihh (Indian Hedge Hog; H88), dem M anti Human TGF β (Transforming Growth Factor) und dem R anti basic FGF $_2$ (Fibroblast Growth Factor) Antikörper inkubiert wurden, war eine Vorbehandlung nicht nötig. Anschliessend wurden alle histologischen Schnitte 4 x blockiert, wobei zwischen den verschiedenen Schritten jeweils mit PBS (Phosphate Buffer Saline, pH 8) gewaschen wurde. Als erstes erfolgte der H $_2$ O $_2$ Block, für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT), mittels 100 μ l einer 3% H $_2$ O $_2$ -Lösung, versetzt mit 0.2% NaN $_3$ und H $_2$ O (Hydrogenperoxide 30%, Art. 95300, Fluka, Buchs SG, Schweiz; Natriumazid, Art. K305.1, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) zur Blockierung der endogenen Peroxidase. Anschliessend erfolgte der Avidin-Biotin-Block von je 20 minütiger Dauer bei RT (Blocking Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame CA 94010, USA). Schlussendlich folgte der Proteinblock von 10 minütiger Dauer (Dako Cytomation Protein Block, Serum-Free Ready-to-Use, Art. X0909) bei RT.

Nun waren die Schnitte bereit für die Inkubation mit den Primärantikörpern, mit welchen gesuchte Epitope oder Antigene markiert werden können. Folgende Antikörper wurden verwendet: R (Rabbit) anti Human MMP-13 (Verdünnung 1:10, Lab Vision/NeoMarkers), M (Mouse) anti PTHR Type 1 (Verdünnung 1:10, Lab Vision/NeoMarkers), R anti PTHrP (H 137) (Verdünnung 1:3, Santa Cruz Biotechnology), R anti Ihh (H88) (Verdünnung 1:3, Santa Cruz Biotechnology), R anti basic FGF-2 (Verdünnung 1:1000, Chemicon) und der M anti Human TGF beta Antikörper (1:100, Chemicon). Die Schnitte wurden jeweils über Nacht bei RT inkubiert, wobei wie auch für die restlichen Laborschritte, immer eine Positiv- wie auch eine Negativ-Kontrolle mitgeführt wurden.

Nach einem weiteren Spülgang mit PBS wurden alle Schnitte mit ChemMateTM (Peroxidase Conjugated DAKO, Detection Kit, Art. K 5003, Dako Cytomation), ein Peroxidase-Kit mit einem Sekundär-Antikörper und Streptavidin-Peroxidase zu je 15 Minuten bei RT inkubiert. Dann wurden die Schnitte mit einem Chromogen angefärbt, welches mit der Peroxidase aus dem vorangehenden Schritt reagiert (AEC (RED), Substrate Kit, Art. 00-2007, Zymed Laboratories Inc., Invitrogen, Carlsbad, CA 92008 USA). Die Farbentwicklung der histologischen Schnitte wurde individuell im Mikroskop kontrolliert und dauerte rund 10-20 Minuten. Abschliessend wurden die Schnitte mittels Kaisers Glyceringelatine (C $_3$ H $_8$ O $_3$, Nr. 1.09242.0100, Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland) und einem Deckglas eingedeckt.

Zur Kontrolle wurde von jeder Knochenprobe immer auch ein Leerschnitt, d.h. ein ungefärbter, ebenfalls auf Objektträger aufgezogener Schnitt aufbewahrt. Für die rein morphologische Analyse wurde eine Hematoxylin-Eosin, sog. HE-Schnittreihe hergestellt.

3.6 Histologie

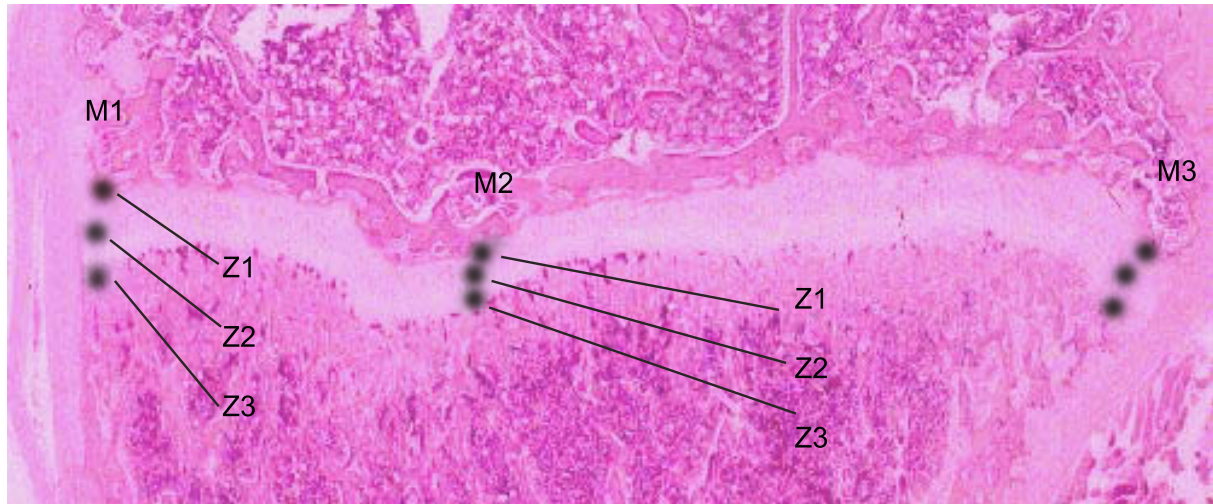
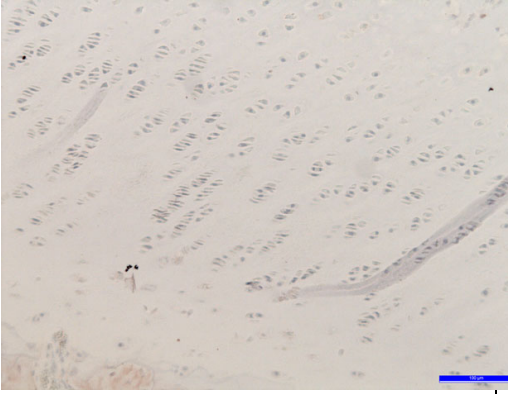
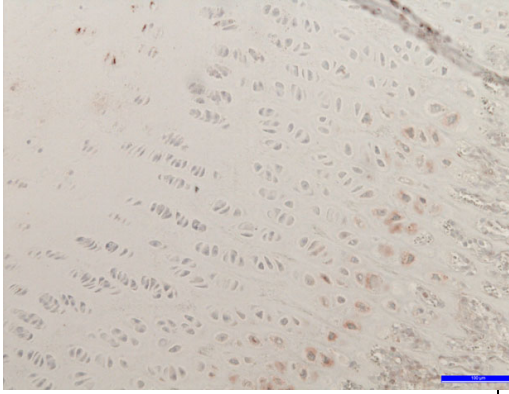
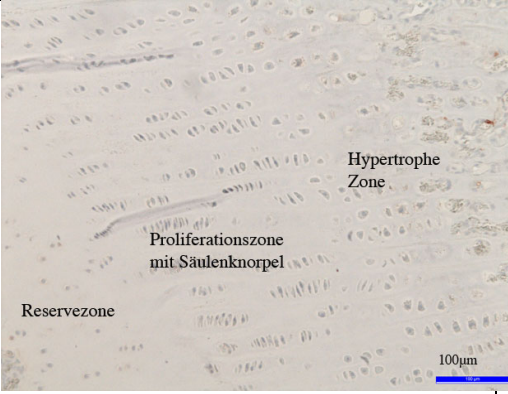
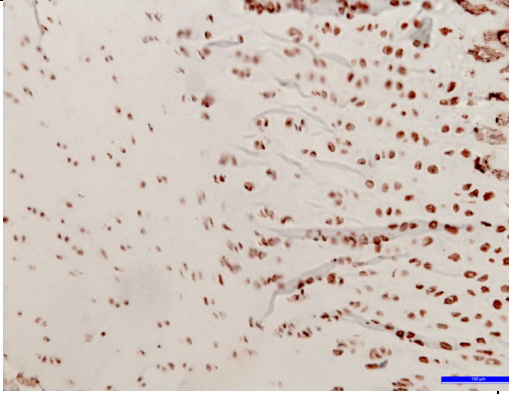
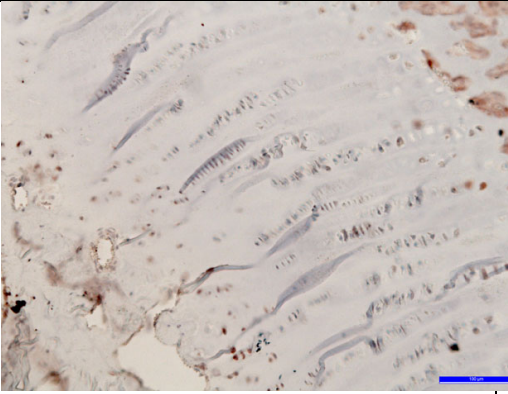
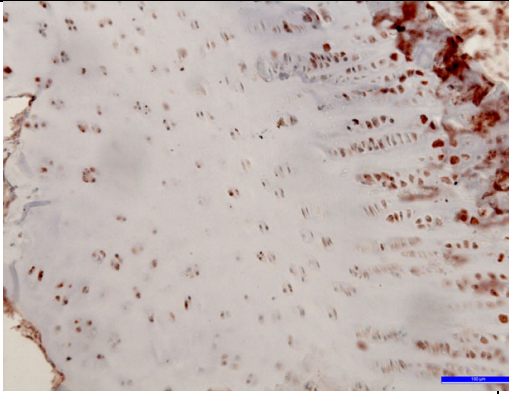


Abb. 3.3 Schematische Darstellung der Messpunkte einer Epiphysenfuge

Nach einer Allgemeinbeurteilung am HE-Schnitt erfolgten die weiteren histologischen Untersuchungen an Dünnschnitten bei 200-facher (20er-Objektiv) Vergrößerung im Lichtmikroskop (Leica DMR®; Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Deutschland). Dazu wurde die GP gemäss Abb. 3.6.1. in drei Messbereiche (M1-M3) unterteilt von anterior über zentral nach posterior, wobei pro Messpunkt jeweils drei semiquantitative Bewertungen durchgeführt wurden. Die erste Messung wurde in der Reservezone (Z1) gemacht, die zweite in der proliferativen (Säulenknorpel-) Zone (Z2) und die dritte Messung in der hypertrophen Zone (Z3). Schliesslich wurden nicht nur die genannten Zonen untersucht, sondern es wurde auch das Perichondrium bezüglich Anfärbung und Intensität bewertet. Der Objektträger wurde jeweils so ins Mikroskop eingespannt, dass beim Blick durch die Okulare die Messungen durchgehend von links nach rechts und von unten nach oben vorgenommen werden konnten; d.h. die in der GP „oben“ liegende Zellschicht war die der Reserve- und proliferierenden Zellen. Jede Messung wurde nach den folgenden zwei Kriterien beurteilt:

1. Ist das Untersuchungsgebiet angefärbt?
2. Wie stark ist die Farbintensität auf einer semiquantitativen Skala von 1-4?
 - Färbung (FZ): Angefärbt: Ja = 1
 Keine Färbung: Nein = 0

- Farbintensität (IZ):
 0 = keine Zellen angefärbt
 1 = ein Viertel der Zellen angefärbt
 2 = die Hälfte der Zellen angefärbt
 3 = drei Viertel der Zellen angefärbt
 4 = alle Zellen angefärbt

Molecule	Growth Plate		Day
	Control limb	Operated limb	
Ihh			2d
PTHr			2d
FGF			14d

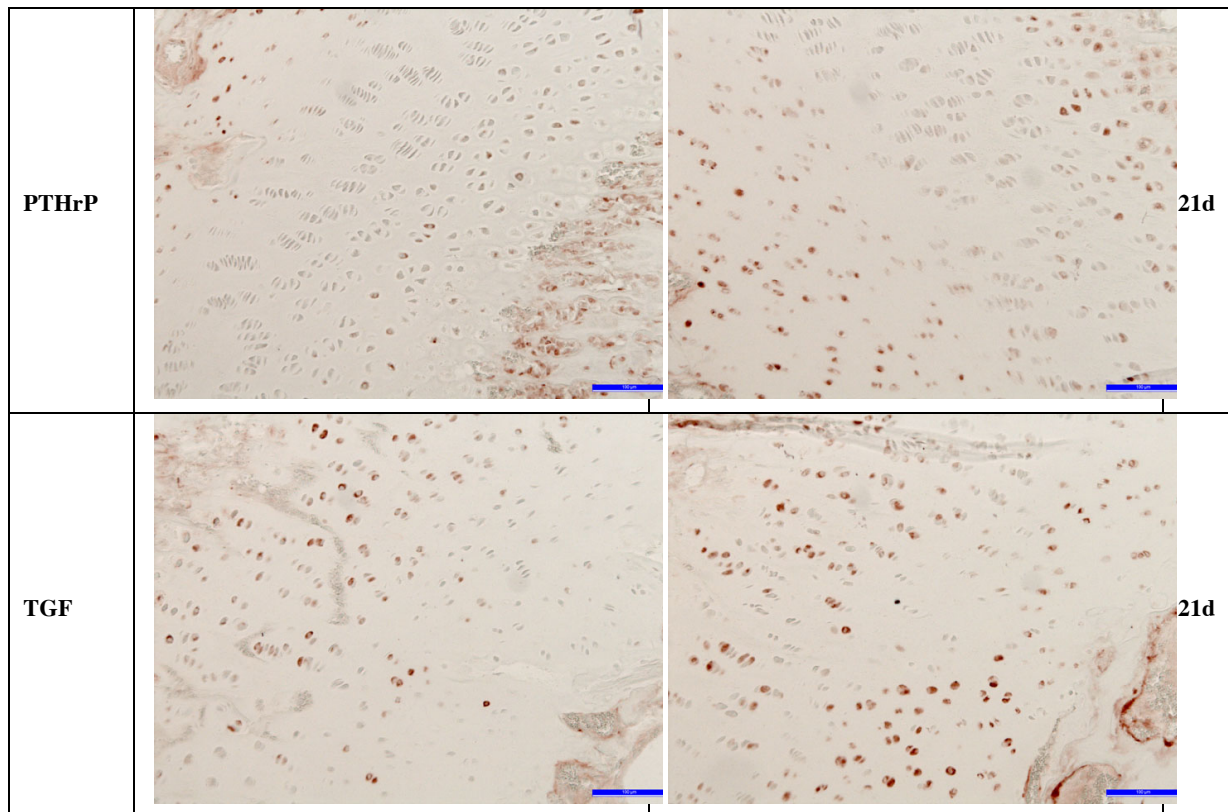
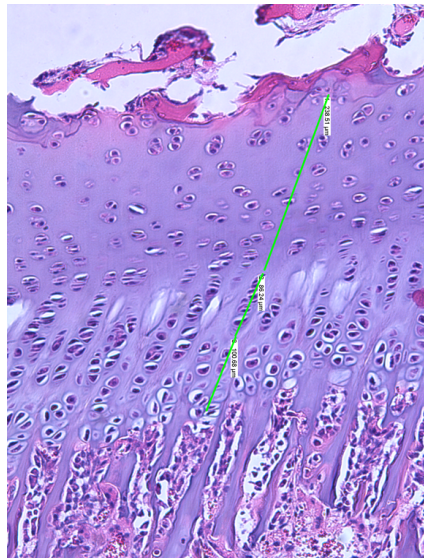


Abb. 3.4 Immunhistochemisch präparierte GP-Schnitte im Lichtmikroskop

Die HE-Schnitte wurden zudem histomorphometrisch ausgemessen (QUIPS/Qwin, Leica, Heerbrugg Switzerland), d.h. einerseits wurde die gesamte GP, andererseits die einzelnen Zonen (Reservezone, Proliferative Zone und Hypertrophe Zone) vermessen. Dies geschah immer parallel zur isogenen Zellanordnung der Säulenknorpelzone und jeweils an vier Messpunkten pro GP. Schlussendlich führte dies zu acht Messwerten pro Versuchspaar. Die absoluten Messergebnisse der jeweiligen Zonen wurden in Prozente umgerechnet und in Relation zur gesamten GP gesetzt.

Alle Ergebnisse wurden sortiert nach Versuchstier und Schlachttag und zur späteren statistischen Analyse in Tabellen eingetragen.



Reservezone

Proliferationszone

Hypertrophe Zone

Eröffnungszone

Abb. 3.5 GP-Längenmessung anhand von 4 Fixpunkten im HE-Schnitt

3.7 Statistik

Die Ergebnisse des semiquantitativen Scorings wurden mit Hilfe des Statistik-Computersystems SPSS Version 11.0 ausgewertet. Hierzu wurden die Daten der Immunhistologie einer faktoriellen Varianzanalyse unterzogen und des weiteren Mittelwert und Standardabweichung für die deskriptive Statistik errechnet. Es wurden sowohl Unterschiede zwischen operierten und nicht-operierten Proben als auch zwischen den verschiedenen Schlachtgruppen berücksichtigt. Als statistisch signifikant galt ein Wert $p < 0.05$.

4 Ergebnisse

4.1 Operation und postoperative Phase

Sowohl die Operationen als auch die postoperative Phase verliefen komplikationslos. Das Allgemeinbefinden aller Lämmer war unauffällig, die Wundheilung erfolgte per primam Intentionem und die Lämmer zeigten keine Lahmheitserscheinungen. In der Folge konnten alle Versuchspaare, entsprechend der geplanten Versuchsanordnung nach 2, 6, 10, 14, 18, 21 bzw. 22 Tagen geschlachtet werden. Somit dürfen durchwegs standardisierte Bedingungen vorausgesetzt werden.

4.2 Probenaufbereitung

Die Probenentnahme ging ohne Probleme von statten. Damit die Knochenproben für die histologische Verarbeitung zufriedenstellend entkalkt werden konnten, mussten die Knochenstücke in sehr dünne Schnitte zersägt werden, was verschiedentlich zu Rissen und Ablösungen zwischen den weicheren Strukturen der knorpeligen Wachstumsfuge und der viel dichteren, knöchernen Metaphyse führte. Obwohl die Weiterverarbeitung zu lichtmikroskopisch beurteilbaren Dünnschnitten, d.h. das Aufziehen auf Objektträger, die anschliessende Färbung und immunhistochemische Aufbereitung mit grösserter Sorgfalt durchgeführt wurden, erfuhren einige Schnitte weitere Qualitätseinbussen in Form von Gewebssrissen, Ablösen vom Objektträger oder, insbesondere randständige Probenbereiche, inadäquater Anfärbung. Da sehr viele Proben zur Verfügung standen und meist nur einzelne Messpunkte eines Histologieschnittes betroffen waren, reichte das Material aber sowohl in qualitativer wie auch quantitativer Hinsicht problemlos aus.

4.3 Histologische Auswertung

In den folgenden Ausführungen sind zunächst die **Mittelwerte** der untersuchten 12 verschiedenen Lokalisationen für die jeweilige immunhistochemische Reaktion in den Kapiteln 4.3.1-4.3.5 aufgeführt. Dabei wurden an den Knochen Radius, Metacarpus, Tibia und Metatarsus jeweils 3 Stellen (anterior, zentral und posterior) beurteilt und semiquantitativ bewertet. Die Übersichtstabellen von Mittelwert und Abweichung der semiquantitativen Beurteilung aller Proben sind im Kapitel 6. Tabellen dokumentiert.

Im Kapitel 5 „Interpretation“ sind dann die **Verlaufskurven der Mittelwerte** der betreffenden immunhistochemischen Reaktionen an Radius und Tibia zu den verschiedenen Zeitpunkten post operationem dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Proben morphologisch eine normale GP aufwiesen, d.h. der Zonenaufbau in struktureller Hinsicht der Literatur entsprach, die Knochenproben operierter Gliedmassen im Mikroskop, ausser PTHR- und TGF_{β} -markierte Schnitte, deutlich häufiger und signifikant intensiver angefärbt waren, d.h. höhere Farbscores hatten als solche von Kontrollen (Vgl. Abb. 4.1). Des Weiteren fiel auf, dass die minimale Farbintensität aller operierten Proben leicht höher war, die Maximalwerte von einzelnen Markern gar signifikant höher lagen.

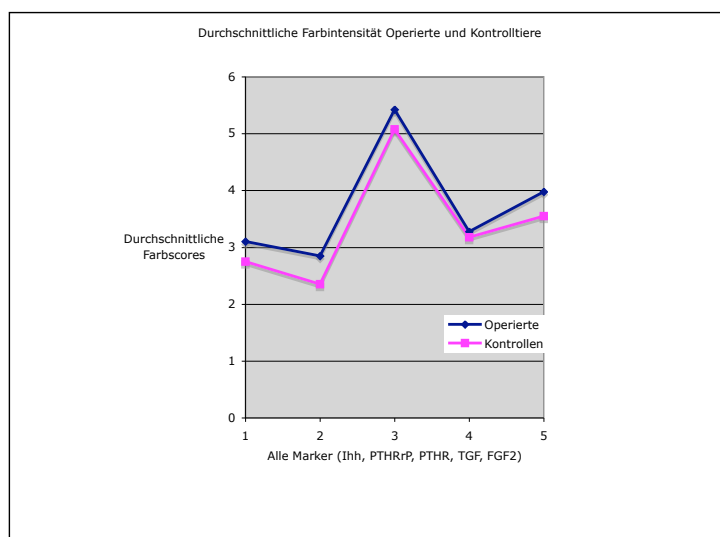


Abb. 4.1 Durchschnittliche Farbscore operierter vs. Kontrollproben

Erläuterung Diagramm, Abb 4.1:

Abszisse: Immunhistochemische Untersuchungsgruppen (1 = Ihh, 2 = PTHrP, 3 = PTHR, 4 = TGF_{β} , 5 = FGF2)

Ordinate: Mittelwerte der Summen gemessener Farbscores in je drei Zonen an jeweils drei definierten Messpunkten

4.3.1 Immunhistologische Auswertung: Ihh (Indian hedgehog)

- Färbung OP: 86% der Proben angefärbt
Kontrolle: 80% der Proben angefärbt
- Intensität OP: 3.11 (\emptyset aus Summe von IZ1 + IZ2 + IZ3)
Kontrolle: 2.77
- Intensität Zone: Zone 2 am schwächsten angefärbt; sowohl OP als auch K

- Messpunkte: Randzonen M1 & M3 intensiver gefärbt, bezüglich Qualität und Quantität
- Zeit: Höchste Scores 18. & 21. Tag, weiterer kleiner Peak zwischen Tag 2-10
Niedrigste Werte 10. Tag
- Signifikanz: $p = 0.000$; Alle Ergebnisse, sowohl bezüglich der OP- als auch der Kontrollproben, sind von höchster Signifikanz und Zuverlässigkeit

Makroskopisch zeigten die Ihh-markierten Proben die deutlichsten Farbverläufe auf. Von blossen Auge waren die unterschiedlichen Zonen der GP erkennbar. In 86% aller operierten Proben konnte mittels Immunhistochemie Ihh nachgewiesen werden, innerhalb der Kontrollen waren 80% der histologischen Schnitte angefärbt. Auch bezüglich der Farbintensität unterschieden sich operierte und nicht-operierte Knochenschnitte: Während die Kontrollen mit der Durchschnittssumme 2.77 bewertet wurden, wiesen Operierte einen Durchschnittsscore von 3.11 von maximal 12 (Summe aus IZ1 + IZ2 + IZ3) auf.

Unter Vernachlässigung der Lokalisation (Gelenk) ergab die statistische Auswertung der Ergebnisse, dass sowohl die Anzahl angefärbter Schnitte sowie auch der Farbintensitätsvergleich zwischen OP- & Kontroll-Gruppe innerhalb der drei untersuchten Zonen von hoher Zuverlässigkeit („observed Power“ oP) und grosser Signifikanz (Sig.) waren. Bezüglich der Farbintensität gab es signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zonen. Es fiel auf, dass die Zone 2, der Bereich des Säulenknorpels, durchgehend am schwächsten angefärbt war und somit die geringsten Ihh-Mengen aufwies. Gesamthaft lag der Maximal-Peak innerhalb der OP-Proben nur geringgradig höher als der der Kontrollen. Die minimale Farbintensität und demnach der minimale Ihh-Nachweis war bei den Nicht-Operierten in allen drei GP-Zonen auffällig niedriger; demnach stieg durch die PTE vor allem das Ihh-Minimallevel an. Des Weiteren gab es Unterschiede im Verlaufe der Zeit post operationem: Die Farbintensität nahm gegen Ende der Beobachtungszeit zu (18. & 21. Tag) - mit Ausreissern in der Zone 3 am 2. und 6. Tag post OP. Am 10. Tag wurden durchwegs die niedrigsten Ihh-Mengen nachgewiesen.

4.3.2 Immunhistologische Auswertung: TGF β (Transforming Growth Factor)

- Färbung OP: ca. 80% der Proben angefärbt

Kontrolle: ca. 80% der Proben angefärbt

- Intensität Insgesamt OP-Proben leicht intensiver gefärbt
OP: 3.23 (\emptyset aus Summe von IZ1 + IZ2 + IZ3)
Kontrolle: 2.31
- Intensität Zone: Zone 2 am schwächsten angefärbt; sowohl OP als auch K (20 – 25% schwächer angefärbt)
- Messpunkte: Randzonen M1 & M3 intensiver gefärbt, bezüglich Qual. & Quantität
- Zeit: Höchste Scores 2. & 21. Tag
Niedrigste Werte 6. Tag
- Signifikanz: $p = 0.000$; Alle Ergebnisse, sowohl bezüglich der OP- als auch der Kontrollproben, sind von höchster Signifikanz und Zuverlässigkeit

Im Gegensatz zu den meisten anderen Signalmolekülen konnte TGF_{β} im Gesamtdurchschnitt sowohl in der Kontroll- als auch in der OP-Gruppe in etwa 80% der Proben und somit gleich häufig nachgewiesen werden. Nur am 2. und 21. Tag nach der Operation lag das Total der Anfärbeintensität aller drei Zonen signifikant höher; über alle Zeitintervalle gesehen waren die Kontrollproben sogar etwas intensiver gefärbt (\emptyset 3.31: 3.23). Zudem konnte TGF_{β} im Knochen- und GP-Zentrum in deutlich geringeren Mengen markiert werden und scheint im cortex-nahen Gebiet in signifikant höheren Mengen vorzukommen.

Die am schwächsten angefärbten Schnitte beider Untersuchungsgruppen waren die vom 6. Tag post OP. Unabhängig von Gelenkslokalisation, OP und Zeit, war in der Zone 2 (Proliferationszone) TGF_{β} signifikant weniger nachweisbar. Durchschnittlich konnte TGF_{β} in der Zone 2 nach der OP in 20% niedrigerer Konzentration und bei den Kontrollen in 27% geringerer Menge nachgewiesen werden. Abgesehen von den Ergebnissen über TGF_{β} -Vorkommnisse im Perichondrium dürfen die Messresultate aus statistischer Sicht als sehr zuverlässig angesehen werden.

4.3.3 Immunhistologische Auswertung: PTHR (Parathyroid Hormone Receptor)

- Färbung OP: über 90% der Proben angefärbt
Kontrolle: über 90% der Proben angefärbt
Alle Schnitte intensiv angefärbt → höchste Scores

- Intensität Insgesamt Kontrollproben leicht intensiver (excl. 2. & 21. post OP)
OP: 5.20 (\bar{x} aus Summe von IZ1 + IZ2 + IZ3)
Kontrolle: 5.37
- Intensität Zone: Zone 3 am stärksten angefärbt; sowohl OP als auch K höchste Werte
- Messpunkte: Randzonen M1 & M3 intensiver gefärbt, bezüglich Qual. & Quantität
- Zeit: Höchste Scores 2. (& 18.) Tag
 Niedrigste Werte 6. (10. & 21.) Tag
- Signifikanz: $p = 0.000$ für totale Intensität der OP- & Kontrollproben;
 $p = 0.037$ für Tot-FZ OP-Proben; $p = 0.020$ für Tot-FZ der Kontrollen
 (nur FZ2 signifikant)

Die PTHR-markierten histologischen Schnitte waren allesamt sehr intensiv gefärbt und somit findet man in diesen Tabellen die absolut höchsten Scores (Bsp. Farbintensität am 2. Tag post OP: \bar{x} 3.617 von max. 4 \rightarrow Summe aller Zonen Tot-IZ: \bar{x} 8.37 von max. 12). Sowohl innerhalb der Operierten wie auch der Kontrollen konnte in etwas über 90% der Proben PTHR nachgewiesen werden, weshalb diesbezüglich keine statistisch signifikanten Unterschiede auszumachen waren.

Die PTHR-Konzentration, ausgedrückt durch die Totale-Farbintensität, lag bei den operierten Tieren aber signifikant höher. Ganz besonders in der Zone 3, der hypertrophen Zone, konnte in beiden Untersuchungsgruppen hohe Mengen an PTHR nachgewiesen werden. Die höchsten Werte in Abhängigkeit zur Zeit erreichten die Proben vom 2. (und 18.) Tag. Wie die anderen Marker findet auch der PTHR-Marker im Knochenzentrum weniger Bindungsstellen, entsprechend kommt PTHR in den randständigen Messbereichen M1 und M2 vermehrt vor.

Von höchster Signifikanz und Zuverlässigkeit sind die Farbintensitätsmessungen der Zone 1 und 3, die Messungen der Zone 2 waren nur in Bezug auf die Häufigkeit der angefärbten Zellen (FZ2) statistisch relevant. Die restlichen Werte waren zum Teil von einer rel. hohen oP (observed Power = Zuverlässigkeit), doch nur von geringer Signifikanz.

4.3.4 Immunhistologische Auswertung: PTHrP (Parathyroid related Proteine)

- Färbung OP: 76% der Proben angefärbt

Kontrolle: 67% der Proben angefärbt

Alle Schnitte schwach angefärbt → niedrigsten Scores

- Intensität Insgesamt OP-Proben leicht intensiver
OP: 2.83 (Ø aus Summe von IZ1 + IZ2 + IZ3)
Kontrolle: 2.34
- Intensität Zone: Zone 2 am schwächsten angefärbt; sowohl OP als auch K
- Messpunkte: Randzonen M1 & M3 intensiver gefärbt, bezüglich Qual. & Quantität
- Zeit: Höchste Scores 2. & 14. (18.) Tag
Niedrigste Werte 10. Tag
- Signifikanz: $p = 0.004$ OP-Werte
 $p = 0.104$ bezüglich der Kontrollproben (nur IZ der Zone 1 signifikant)

PTHrP-markierte Histologieschnitte waren die am schwächsten gefärbten Proben. Von den Operierten zeigten etwa 76% der Zellen eine Farbreaktion, von den Kontrollen 67%. Auch die in Zahlen ausgedrückte Intensität ergab ein ähnliches Bild, post operationem betrug die von der Gelenkslokalisation unabhängige Summe der Scores aus Zone 1, 2 und 3 im Durchschnitt über alle Schlachtproben gesehen 2.83 von und bei den Kontrollen 2.34 von max. 12 Scores. Dieselbe Tendenz zeigte sich in den einzelnen Zonen und über alle Zeitintervalle hinweg, wobei wie bei den anderen Markern in der Zone 2 signifikant niedrigere Konzentrationen nachgewiesen werden konnten. Die operierten Proben erreichten am 2., 14. und 21. Tag Höchstwerte wobei in Zone 1 am 2. und 14. Tag mit 1.4 (von max. 4) am meisten PTHrP nachgewiesen werden konnte. Innerhalb der nicht-operierten Knochenproben gab es keine so deutlichen Peaks, in der Zone 1 ergab sich mit 1.25 am 18. Tag ein Höchstwert, in der Zone 2 war die PTHrP-Färbeintensität am 6., 8. und 21. Tag mit einem Score von 0.6 ausgeglichen niedrig und in Zone 3 am 6., 14. (und 18.) Tag mit Werten um 1.1 ähnlich breit gefächert. Anders verhielt es sich mit dem Minimal-Peak, der in beiden Untersuchungsgruppen praktisch durchgehend am 10. Tag anzusiedeln war.

Ausser den Ergebnissen betreffend der quantitativen Färbung in der Zone 2 (FZ2) und den Resultaten bezüglich PTHrP-Nachweis im Perichondrium, darf von einer hohen Aussagekraft der Ergebnisse ausgegangen werden, da sowohl die statistische Signifikanz als auch oP im Höchstbereich liegen.

4.3.5 Immunhistologische Auswertung: FGF₂ (Fibroblast Growth Factor)

- Färbung OP: 94% der Proben angefärbt
Kontrolle: 93% der Proben angefärbt
(Peaks innerhalb der OP-Proben)
- Intensität OP: 4.12 (Ø aus Summe von IZ1 + IZ2 + IZ3)
Kontrolle: 3.61
- Intensität Zone: Zone 2 am schwächsten angefärbt;
Zone 1 auffällig intensiv
- Messpunkte: Randzonen M1 & M3 intensiver gefärbt, bezüglich Qual. & Quantität
- Zeit: Höchste Scores 2. & 21. Tag in der OP-Gruppe,
10. & 18. Tag K-Gruppe
Niedrigste Werte 6. Tag
- Signifikanz: $p = 0.187$ OP-Proben (keine Zone mit sig. Ergebnissen)
 $p = 0.475$ Kontrollproben (nur IZ der Zone 1 signifikant)

Obwohl die absolut höchsten Peaks und Messwerte innerhalb der operierten Proben angesiedelt sind, liegen die aufsummierten Durchschnittswerte bezüglich FGF₂-Nachweisbarkeit mit 94% und 93% in der OP- und Kontrollgruppe praktisch gleich hoch. Der Unterschied liegt demnach in der Zellkonzentration von FGF₂ und schlägt sich in der Farbintensität nieder. Operierte Schnitte wiesen eine durchschnittliche, lokalitäts- und zeitunabhängige Summe von 4.12 und Kontroll-Schnitte von 3.61 von max. 12 auf. Innerhalb der OP-Gruppe konnten Höchstwerte praktisch immer am 2. Tag post OP gemessen werden, wobei die Zone 1 mit einem Durchschnittscore von 1.95 die höchste Konzentration an FGF₂ aufwies. Einzig die Messergebnisse aus Zone 1 der Kontrollen erwiesen sich in Bezug auf die Statistik von Bedeutung, d.h. nur diese waren von relevanter Signifikanz und Zuverlässigkeit. Tiefstwerte wiesen unter den operierten Proben diejenigen vom 6. Tag post OP auf, innerhalb der Kontrollen waren es die Proben vom 6. und 10. Tag. Die höchsten Scores erzielten Kontrollschnitte vom 10., 18. und 21. Tag. In der Zone 2 konnte in beiden Untersuchungsgruppen die niedrigste Farbintensität und somit FGF₂-Konzentration nachgewiesen werden.

Da sowohl Signifikanz und oP der FGF₂-Testreihe unbefriedigend sind, kann bezüglich dem Vorkommen von FGF₂ nur eine Aussage über die Tendenz zu höherer Farbintensität operierter Proben gemacht werden; mit den höchsten Werten 2 Tage nach der OP.

4.3.6 Messungen Perichondrium

Das Perichondrium der operierten Proben wies zum Teil sehr intensive Aktivität auf, d.h. schien subjektiv auch makroskopisch bei der Probenaufbereitung hoch proliferativ und zeigte immunhistochemisch hohe Farbintensität. Die absoluten Zahlen und Summen waren jedoch statistisch gesehen ungenügend, da das Perichondrium oft zerrissen, fehlend oder sich, aufgrund der Randnähe zum Objektträger, technisch inadäquat anfärben liess.

4.3.7 Quantitative Längenmessung der Growth Plate

Das Ausmessen der GP gestaltete sich insofern als Herausforderung, als dass die Wachstumsfuge im Mikroskop nicht durchgehend dieselbe Dicke aufweist und der Säulenknorpel im histologischen Schnitt nicht permanent linear bzw. achsentreu angeordnet ist. Statistisch gesehen konnten keine signifikanten Längenunterschiede zwischen operierten und nicht-operierten GPs festgestellt werden, weder für die gesamte GP noch für die unterschiedlichen Zonen. Es zeichneten sich jedoch einige Tendenzen ab, wie eine leicht erhöhte Gesamtlänge operierter Proben um Tag 10-18 bei Radius und Tibia. Bezüglich der einzelnen Zonen konnte zwischen Tag 10-14 bei der Tibia, zwischen Tag 4-10 beim Radius eine leicht verbreiterte proliferative Zone beobachtet werden. Die Ergebnisse der Reserve Zone variierten sehr stark, die hypertrophe Zone wies sowohl im Radius wie auch in der Tibia verminderte Werte auf.

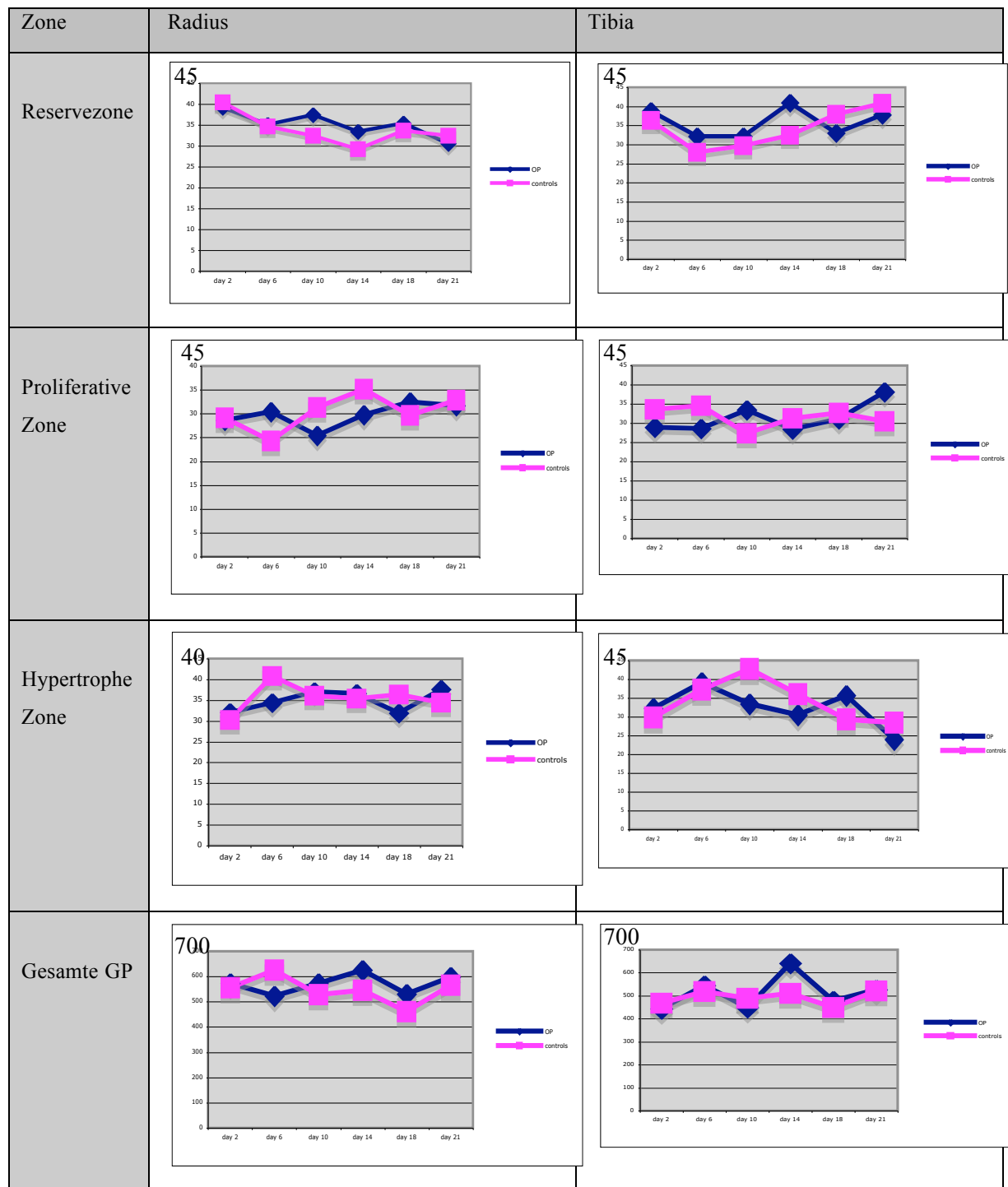


Abb. 4.2 Längenmessungen der GP in μm (Ordinate)

Gemessen an den Tagen 2, 6, 10, 18 und 21 (Abszisse) post OP

5 Interpretation

5.1.1 Allgemein

Da mit einem Tiermodell und semiquantitativen Methoden gearbeitet wurde, lassen sich weniger absolute Aussagen machen als vielmehr Tendenzen aufzeigen. Die subjektiv und objektiv erlangten Eindrücke dieser Studie lassen folgende Interpretation zu: PTE scheint einen Einfluss auf die „Up- and Down“-Regulation verschiedenster knochenwachstumsassoziierten, biomolekularer Mechanismen zu haben, da fast durchgehend höhere Scoringresultate in Proben operierter Gliedmassen nachgewiesen werden konnten. Auch die in der Folgestudie (Friederike von Wedel) erfolgten Längenmessungen bestätigten zumindest subjektiv diesen Eindruck. Die unterschiedlichen Reaktionen auf den chirurgischen Eingriff bzw. der abweichende Verlauf der Signalfaktorenkonzentration bezogen auf die OP-Lokalisation lassen folgende mögliche Erklärung zu: 1. Die Ossifikation der Wachstumsfugen der untersuchten Knochen verläuft asynchron (vgl. Einleitung). 2. In unterschiedlichen Entwicklungsstadien reagiert die GP auf simultan erfolgende Stimuli deshalb umgehend mit einem Faktorenanstieg oder eben verzögert. 3. Das (Längen-)Wachstumspotenzial einer spezifischen Wachstumsfuge unterscheidet sich bezüglich Individuum, Knochen und proximale oder distale Lokalisation (Habermehl 1975).

Dies zeigte sich in den wiederholt beobachteten ondulierenden Kurven graphischer Darstellungen. Häufig zeigten die verschiedenen Knochen ähnliche Amplituden, jedoch zeitlich verschoben.

Da Tibia und Radius in dieser Studie die höchste statistische Relevanz aufwiesen, erfolgen weitere Exkurse und die Interpretation anhand der Ergebnisse dieser zwei OP-Lokalisationen. Mittels schematischen Visualisierungen des Farbintensitätsverlaufs in Relation zur Zeit lassen sich am einfachsten beobachtete Tendenzen darstellen.

5.1.2 Immunhistologie Ihh (Indian hedgehog)

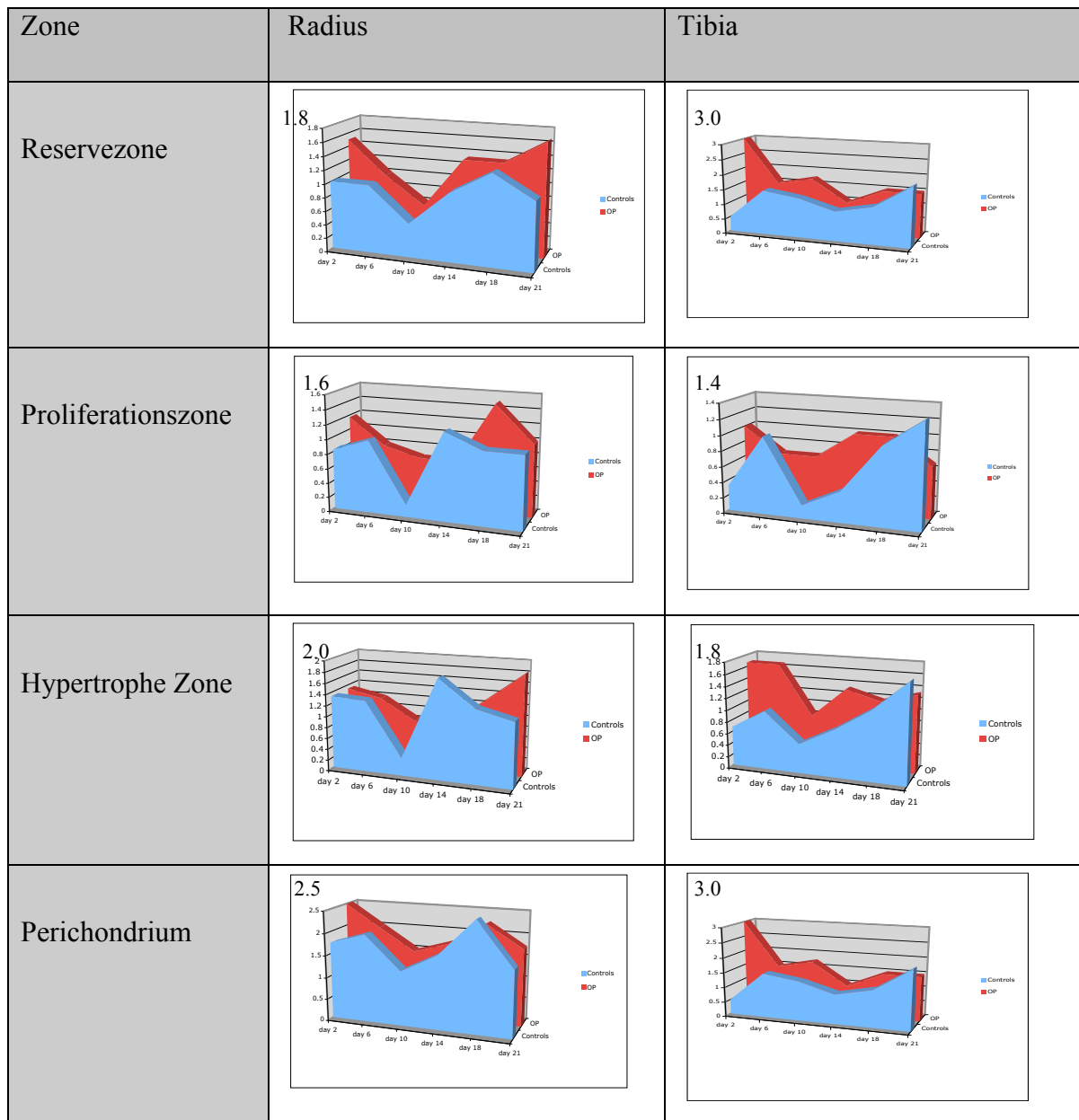


Abb. 5.1 Durchschnittliche Farbintensität unterschiedlicher GP-Zonen von Radius und Tibia bezüglich Marker Ihh (Abszisse: Tage post OP; Ordinate: Score)

Ihh liess sich in allen Zonen der GP, jedoch vermehrt bei operierten Proben, nachweisen. Besonders, kurz nach der Operation (2d), mit nachfolgender Gegenregulation und erneutem Peak im letzten Drittel der untersuchten Zeit (18-21d), scheint Ihh vermehrt exprimiert zu werden. Im Radius liess sich die Aufregulierung prononcierter darstellen, was wie bereits erwähnt, wahrscheinlich auf die zeitlich asynchrone Entwicklung der Wachstumsfuge und deren unterschiedliches Ossifikationsstadium zurückzuführen ist. Bezüglich der Kontrollgruppe wurden die höchsten Werte in der Reservezone und der hypertrophen Zone

(und im Perichondrium) gemessen. Dies macht durchaus Sinn und korreliert mit den Angaben in der Literatur, da Ihh die Regulation der Chondrocytendifferenzierung zugeschrieben wird. Ein Anstieg von Ihh stimuliert das Knochenlängenwachstum auf Ebene der Wachstumsfuge bis es zur Gegenregulation durch PTHrP kommt.

5.1.3 Immunhistologie PTHrP (Parathyroid related Proteine)

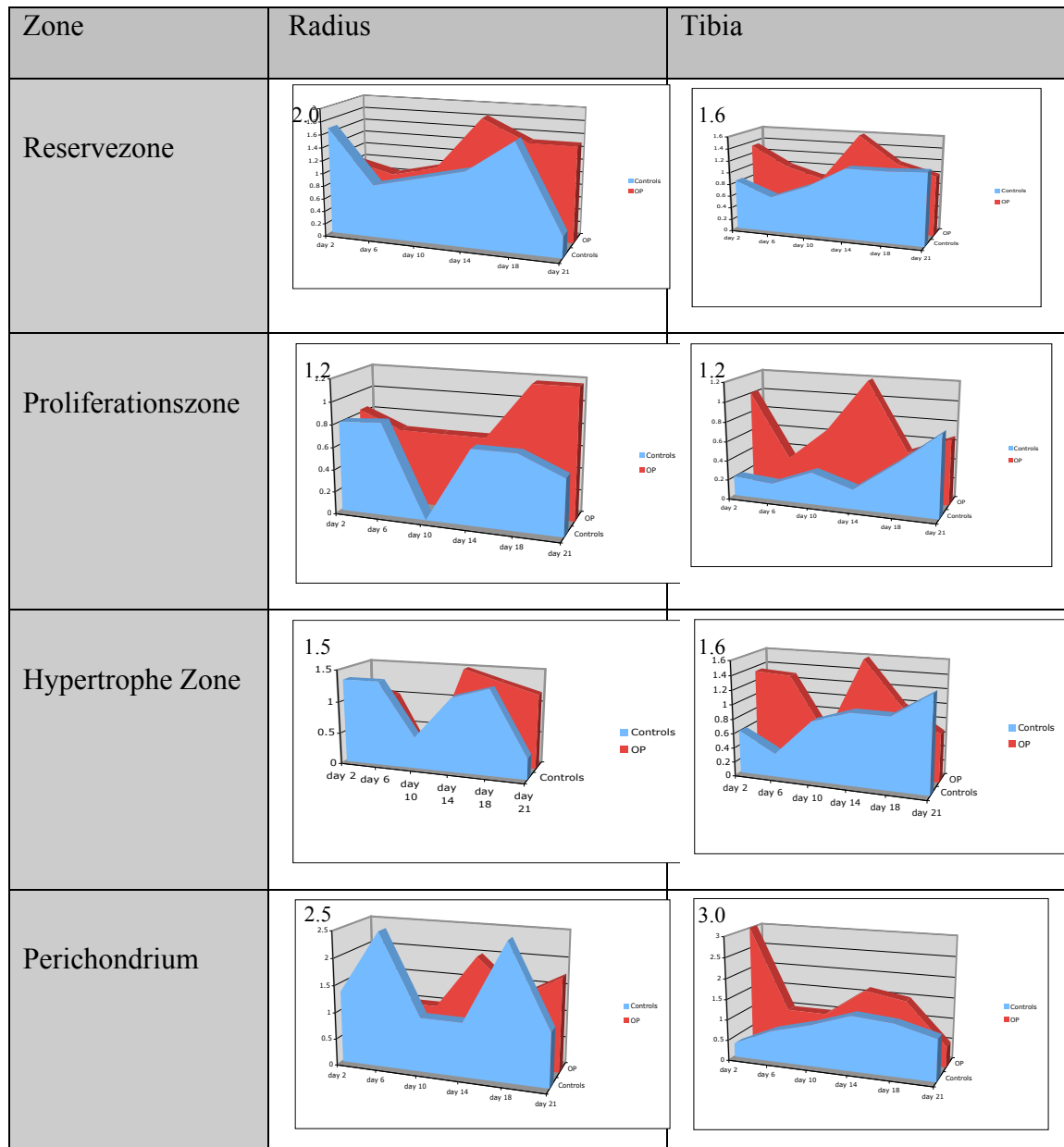


Abb. 5.2 Durchschnittliche Farbintensität unterschiedlicher GP-Zonen von Radius und Tibia bezüglich Marker PTHrP

Auch PTHrP kam im Vergleich zur Kontrollgruppe post Operationem in erhöhten Konzentrationen vor. Die höchsten Mengen von PTHrP konnten im Perichondrium nachgewiesen werden. Der deutlichste Peak erfolgte jeweils gegen Ende der

Untersuchungsperiode, zwischen Tag 14 und 21. In der Tibia kam es zudem zu einer Aufregulierung kurz post Stimulus, da zu diesem Zeitpunkt die basale PTHrP-Konzentration in der Tibia tief lag. Im Gegensatz dazu nahm die PTHrP-Menge im Radius am Anfang der Messperiode kaum zu, es konnte nur ein signifikanter Anstieg im letzten Drittel nachgewiesen werden. Der zeitlich versetzte Konzentrationsverlauf von Ihh und PTHrP unterstützt die These einer Kopplung dieser beiden Signalmoleküle. Steigt die Ihh-Konzentration, wird wiederum die PTHrP- und PTHR-Expression stimuliert, dies führt in der Folge zu einem negativen Feedback, das heisst einer späteren Hemmung des Knochenlängenwachstums.

5.1.4 Immunhistologie PTHR (Parathyroid Hormone Receptor)

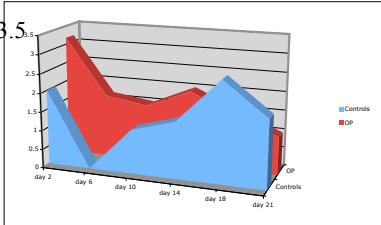
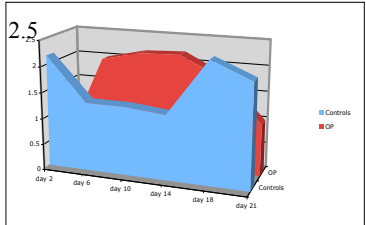
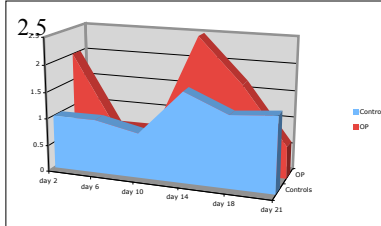
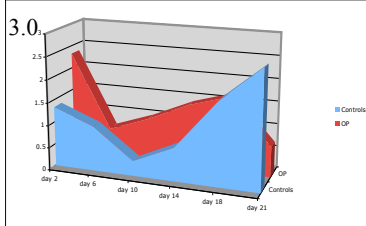
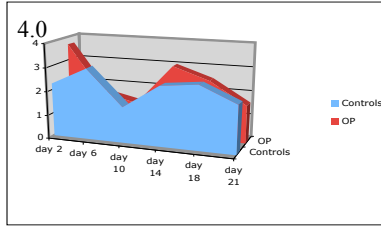
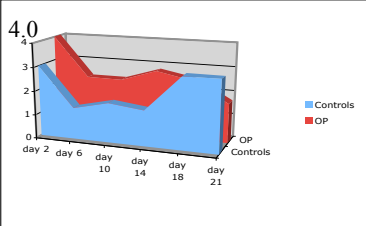
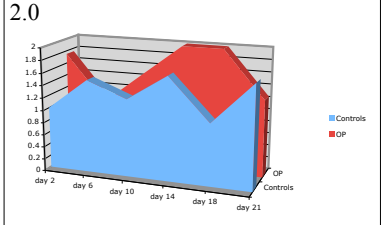
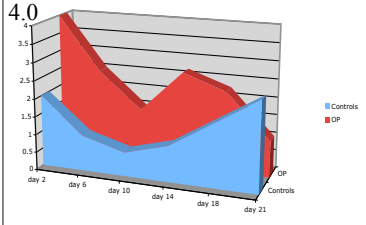
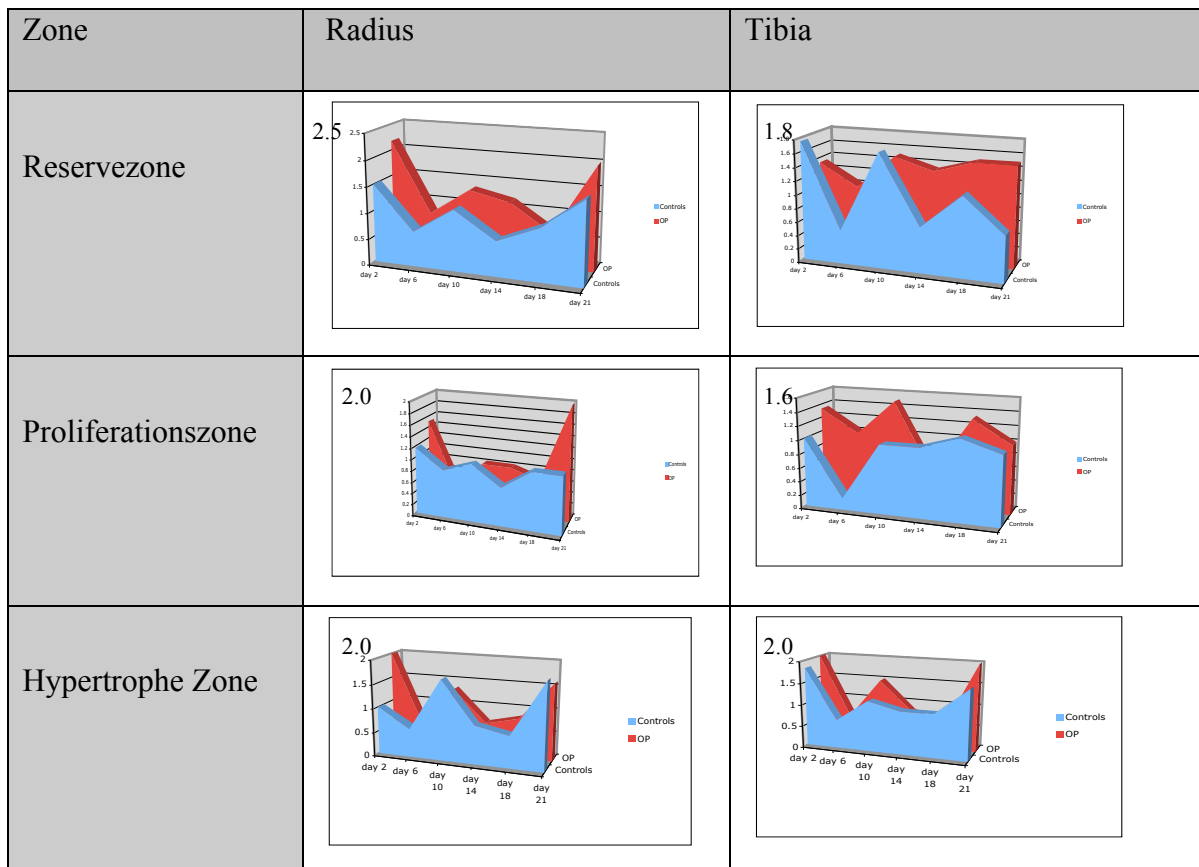
Zone	Radius	Tibia
Reservezone		
Proliferationszone		
Hypertrophe Zone		
Perichondrium		

Abb. 5.3 Durchschnittliche Farbintensität unterschiedlicher GP-Zonen von Radius und Tibia bezüglich Marker PTHR

In allen Zonen konnte besonders nach den Operationen, PTHR in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden. Ähnlich wie bei PTHrP zeigten die Messungen zwei Peaks, jeweils einen anfangs Messperiode um den zweiten Tag post OP, und wiederum zwischen dem 14. und 18. Tag nach chirurgischer Intervention. Die höchste Konzentration an PTHR wurde wie in der Literatur beschrieben in der (früh-)hypertrophen Zone nachgewiesen, zu einer auffälligen Aufregulierung kam es sowohl in der Tibia wie auch im Radius kurz nach der OP. Auf dieser Ebene wird das durch Ihh induzierte Knochenlängenwachstum durch Hemmung der Chondrocytendifferenzierung gebremst. Obwohl die Ergebnisse aufgrund der grossen technischen Herausforderung (oft zerrissen, unregelmässige Anfärbequalität wegen Objektträgerannähe) z.T. keine statistische Zuverlässigkeit aufwiesen, konnten besonders in der Tibia durchgehend PTHR-Höchstwerte im periartikulären Perichondrium nachgewiesen werden.

5.1.5 Immunhistologie TGF β (Transforming Growth Factor)



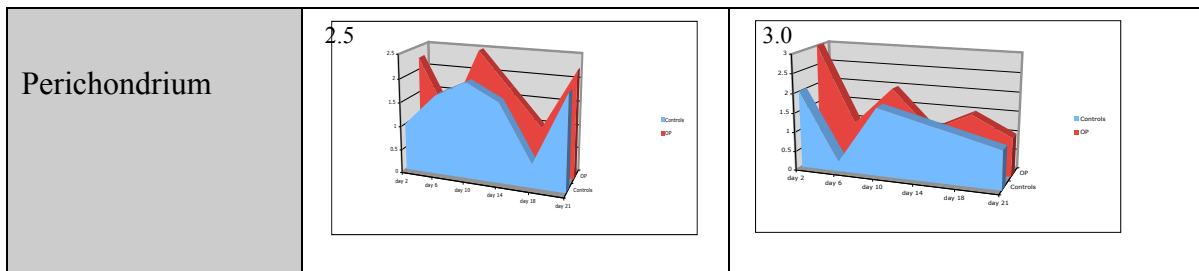
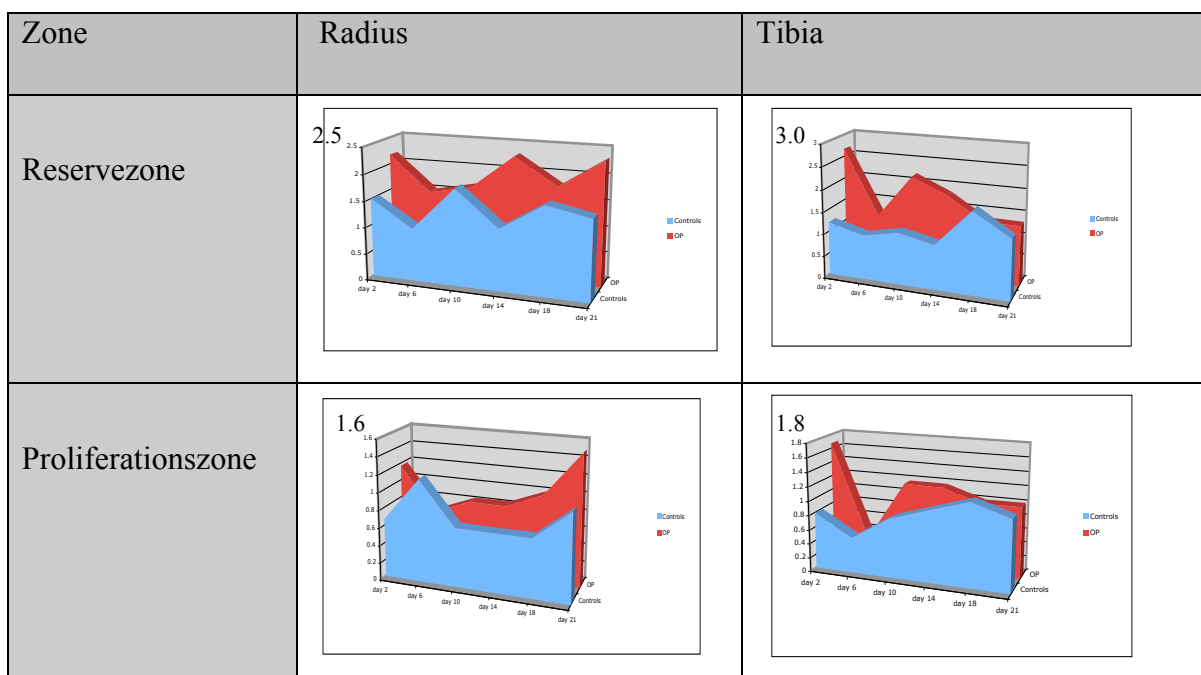


Abb. 5.4 Durchschnittliche Farbintensität unterschiedlicher GP-Zonen von Radius und Tibia bezüglich Marker TGF_{β}

Wie auch die restlichen Signalmoleküle konnte TGF_{β} in der operierten Proben­gruppe in höherer Konzentration nachgewiesen werden als in der Kontrollgruppe. Sowohl in der Tibia als auch im Radius wurde TGF_{β} „stossweise“ exprimiert, was visuell dargestellt zu drei Peaks führte: Tag 2/6, Tag 10 und Tag 18; während im Radius vor allem die ersten Tage post OP signifikant mehr TGF_{β} nachgewiesen werden konnte, hat in der Tibia die Konzentration im Vergleich zu den Kontrollen auch gegen Ende der Messperiode erhöht. Beide, Tibia und Radius wiesen die höchsten Scores in der Reservezone und im Perichondrium auf. Wie FGF_2 zeigt TGF_{β} einen zeitlich gegenläufigen Konzentrationsverlauf zu Ihh – da beide Wachstumsfaktoren quasi als Signaltransduktoren im Ihh-PTHr/PTHrP-System fungieren, macht dies auch durchaus Sinn.

5.1.6 Immunhistologie FGF_2 (Fibroblast Growth Factor)



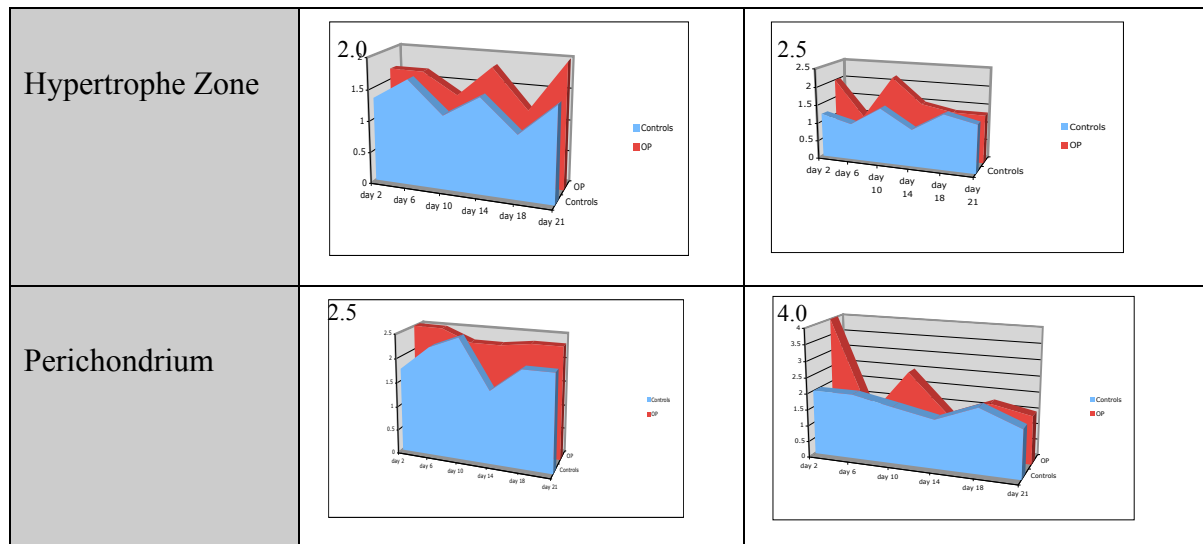


Abb. 5.5 Durchschnittliche Farbintensität unterschiedlicher GP-Zonen von Radius und Tibia bezüglich Marker FGF₂

FGF₂ zeigt einen ähnlich ondulierenden Konzentrationsverlauf wie TGF. Während bei operierten Proben des Radius' Höchstwerte eher gegen Ende der Messperiode auftraten, wies die Tibia anfänglich hohe FGF₂ Konzentrationen auf. Sowohl Tibia als auch Radius zeigten einen signifikanten Konzentrationsabfall am zweiten Tag post OP. Ausserdem wurde FGF₂, wie erwartet, markant im Perichondrium und in der Reservezone exprimiert, wo es als Signalmolekül eine regulatorische Funktion auf die Feedbackmechanismen des Knochenwachstums einnimmt.

6 Tabellen

Mittelwerte und Abweichungen der Färbescores aller immunhistologisch untersuchter Wachstumsfugen

Tabelle: FZ1 - PTHR Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	1	1	1	1	1
Tibia	1	1	1	1	1	1
MC	1	1	1	1	1	1
Radius	1	1	0.83+/-0.4	1	1	1

Tabelle: FZ1 - PTHR OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	1	0.73+/-0.4	1	1	1
Tibia	1	1	1	1	1	1
MC	1	1	1	1	1	1
Radius	1	1	1	1	1	0.8+/-0.4

Tabelle: FZ2 - PTHR Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	1	1.00+/-0.4	0.80+/-0.4	1	0.67+/-0.5
Tibia	1	1	0.33+/-0.5	0.75+/-0.5	1	1
MC	1	0.6+/-0.5	0.5+/-0.5	0.83+/-0.4	1	0.83+/-0.4
Radius	1	0.67+/-0.5	0.83+/-0.4	0.83+/-0.4	1	0.80+/-0.4

Tabelle: FZ2 - PTHR OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	0.8+/-0.4	0.5+/-0.5	0.8+/-0.4	1	0.8+/-0.4
Tibia	1	0.67+/-0.5	0.83+/-0.4	1	1	0.67+/-0.5
MC	1	1	0.83+/-0.4	0.83+/-0.4	1	1
Radius	1	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	1	0.83+/-0.4	0.4+/-0.5

Tabelle: FZ3 - PTHR Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	1	1	1	1	1
Tibia	1	1	1	1	1	1
MC	1	1	1	1	1	1
Radius	1	1	0.83+/-0.4	1	1	1

Tabelle: FZ3 - PTHR OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	1	0.83+/-0.4	1	1	1
Tibia	1	1	1	1	1	1
MC	1	1	1	1	1	1
Radius	1	1	1	1	1	0.80+/-0.4

Tabelle: JZ1 - PTHR Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	2.17+/-0.7	2.2+/-0.8	2.17+/-0.7	1.6+/-0.5	1.67+/-0.8	1.67+/-1.2
Tibia	2.17+/-0.9	1.33+/-0.5	1.33+/-0.5	1.25+/-0.5	2.33+/-1.0	2.0+/-0
MC	2.6+/-1.1	1.20+/-0.4	1.0+/-0	1.17+/-0.4	2.20+/-0.8	1.83+/-0.7
Radius	2.0+/-0	1.67+/-0.5	1.17+/-0.9	1.5+/-0.5	2.67+/-0.5	1.8+/-0.8

Tabelle: JZ1 - PTHR OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	2.6+/-1.3	1.4+/-0.5	1.67+/-1.0	1.2+/-0.4	1.5+/-0.5	1.4+/-0.5
Tibia	0.3+/-0.5	2.0+/-1.0	2.17+/-0.7	2.20+/-0.8	1.83+/-0.9	1.0+/-0
MC	3.0+/-0.7	1.4+/-0.5	1.5+/-0.5	1.5+/-0.5	1.5+/-0.5	2.83+/-0.7
Radius	3.17+/-0.7	1.67+/-0.5	1.5+/-0.5	2.0+/-0.8	1.5+/-0.8	1.0+/-0.7

Tabelle: IZ2 - PTHR Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	2.0+/-1.1	1.4+/-0.5	1.0+/-0	0.8+/-0.4	1.33+/-0.5	0.67+/-0.5
Tibia	1.33+/-0.5	1.0+/-0	0.33+/-0.5	0.75+/-0.5	1.83+/-1.1	2.6+/-1.5
MC	1.6+/-0.8	0.6+/-0.5	0.5+/-0.5	1.0+/-0.6	1.6+/-0.8	1.17+/-0.9
Radius	1.0+/-0	1.0+/-1.0	0.83+/-0.4	1.67+/-1.2	1.33+/-0.5	1.4+/-1.14

Tabelle: IZ2 - PTHR OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.4+/-0.5	1.0+/-0.7	0.5+/-0.5	1.2+/-0.8	1.67+/-0.5	n. lesbar
Tibia	2.33+/-0.5	0.67+/-0.5	1.0+/-0.6	1.4+/-0.5	1.67+/-0.8	n. lesbar
MC	1.6+/-0.5	1.0+/-0.0	0.83+/-0.4	2.0+/-1.2	1.33+/-0.5	n. lesbar
Radius	2.0+/-0.6	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	2.50+/-0.8	1.67+/-1.2	n. lesbar

Tabelle: IZ3 - PTHR Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	2.67+/-0.8	2.6+/-0.5	2.0+/-0.6	2.20+/-1.0	2.5+/-0.5	1.83+/-0.7
Tibia	3.0+/-1.0	1.33+/-0.5	1.67+/-0.5	1.5+/-0.5	3.0+/-0.6	3.0+/-0.0
MC	2.6+/-0.8	2.2+/-0.8	1.25+/-0.5	1.5+/-0.8	2.6+/-1.1	2.33+/-1.2
Radius	2.25+/-0.5	3.0+/-1.0	1.5+/-1.0	2.5+/-1.0	2.67+/-0.5	2.0+/-1.0

Tabelle: IZ3 - PTHR OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	3.6+/-0.8	2.0+/-0.7	n. lesbar	1.6+/-0.5	2.17+/-0.7	1.4+/-0.5
Tibia	4.0+/-0.0	2.33+/-1.5	2.33+/-0.5	2.8+/-0.4	2.5+/-0.8	1.6+/-0.5
MC	3.2+/-0.4	2.6+/-1.1	1.83+/-0.7	2.5+/-0.8	2.0+/-0.8	2.5+/-0.8
Radius	3.6+/-0.5	1.67+/-0.5	n. lesbar	3.0+/-0.8	2.5+/-1.0	1.6+/-0.8

Tabelle: IPC - PTHR Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.5+/-0.5	2.0+/-0	1.75+/-0.9	2.0+/-1.0	1.75+/-0.5	1.75+/-0.5
Tibia	2.0+/-1.7	1.0+/-0	0.67+/-0.5	1.0+/-0	1.75+/-0.5	2.5+/-2.12
MC	2.33+/-0.5	1.67+/-0.5	1.0+/-0	1.5+/-0.5	1.67+/-0	1.33+/-0.5
Radius	1.0+/-0	1.5+/-0.7	1.25+/-1.2	1.67+/-1.1	1.0+/-0	1.67+/-0.5

Tabelle: IPC - PTHR OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	2.0+/-1.7	1.0+/-1.4	1.75+/-1.5	2.5+/-0.7	1.5+/-0.5	1.0+/-0
Tibia	4.0+/-0	2.5+/-0.7	1.5+/-0.5	2.67+/-0.5	2.25+/-0.9	1.0+/-0
MC	2.0+/-0	1.5+/-0.7	1.0+/-0	1.67+/-0.5	2.0+/-0	2.33+/-0.5
Radius	1.75+/-0.5	1.0+/-0	1.5+/-0.5	2.0+/-1.1	2.0+/-0.8	1.25+/-0.9

Tabelle: Perichondrium - PTHR Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	1	1	1	1	1
Tibia	1	1	0.67+/-0.5	1	1	1
MC	1	1	1	1	1	1
Radius	1	1	0.75+/-0.5	1	1	1

Tabelle: Perichondrium - PTHR OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	0.5+/-0.7	0.75+/-0.5	1	1	1
Tibia	1	1	1	1	1	1
MC	1	1	1	1	1	1
Radius	1	1	1	1	1	0.75+/-0.5

Tabelle: FZ1 - TGF Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	0.8+/-0.4	1	1	0.83+/-0.4	1
Tibia	1	0.5+/-0.5	1	0.67+/-0.5	1	0.67+/-0.5

MC	1	0.6+/-0.5	0.80+/-0.4	1	1	1
Radius	1	0.67+/-0.5	1	0.67+/-0.5	1	1

Tabelle: FZ1 - TGF OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	0.17+/-0.4	1	0.5+/-0.5	0.83+/-0.4	1
Tibia	1	1	1	1	1	1
MC	1	0.6+/-0.5	0.83+/-0.4	0.67+/-0.5	1	1
Radius	1	0.8+/-0.4	1	1	0.67+/-0.5	1

Tabelle: FZ2 - TGF Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.5 +/-0.5	0.6+/-0.5	0.83+/-0.4	0.43+/-0.5	0.67+/-0.5	0.8+/-0.4
Tibia	1.0+/-0	0.17+/-0.4	0.83+/-0.4	0.67+/-0.5	0.83+/-0.4	0.67+/-0.5
MC	0.8+/-0.4	0.2+/-0.4	0.8+/-0.4	0.5+/-0.5	0.8+/-0.4	1.0+/-0
Radius	1.0+/-0	0.5+/-0.5	1.0+/-0	0.67+/-0.5	1.0+/-0	0.8+/-0.4

Tabelle: FZ2 - TGF OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.0+/-0	0.0+/-0	0.67+/-0.5	0.33+/-0.5	0.83+/-0.4	1
Tibia	1.0+/-0	1	1.0+/-0	0.5+/-0.5	1.0+/-0	1
MC	0.83+/-0.4	0.6+/-0.5	0.83+/-0.4	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	0.83+/-0.4
Radius	1.0+/-0	0.4+/-0.5	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	1

Tabelle: FZ3 - TGF Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.5+/-0.5	0.6+/-0.5	1	1	0.67+/-0.5	1
Tibia	1	0.33+/-0.5	1	0.67+/-0.5	0.83+/-0.4	0.67+/-0.5
MC	0.80+/-0.4	0.8+/-0.4	1	0.83+/-0.4	0.8+/-0.4	1
Radius	0.83+/-0.4	0.67+/-0.5	1	1	1	1

Tabelle: FZ3 - TGF OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.83+/-0.4	0.5+/-0.5	1	0.67+/-0.5	0.83+/-0.4	1
Tibia	1	1	1	0.67+/-0.5	1	1
MC	1	0.4+/-0.5	1	0.33+/-0.5	0.5+/-0.5	1
Radius	1	0.6+/-0.5	1	0.67+/-0.5	0.5+/-0.5	1

Tabelle: IZ1 - TGF Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
----------	--------	--------	---------	---------	---------	---------

MT	1.33	0.8	1.83	1.4	0.83	1.8
Tibia	1.75	0.8	1.67	0.67	1.17	0.67
MC	1.8	0.6	1.4	1.33	1.2	1.5
Radius	1.5	0.67	1.17	0.67	1	1.6

Tabelle: IZ1 - TGF OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	2.0+/-0.8	0.33+/-0.8	1.5+/-0.5	0.5+/-0.5	1.0+/-0.6	1.20+/-0.4
Tibia	1.33+/-0.5	1.0+/-0	1.5+/-0.5	1.33+/-0.5	1.5+/-0.5	1.5+/-0.7
MC	1.33+/-0.5	0.6+/-0.5	1.17+/-0.4	0.67+/-0.5	1.17+/-0.4	1.6+/-0.8
Radius	2.17+/-0.7	0.8+/-0.4	1.33+/-0.5	1.17+/-0.4	0.67+/-0.5	2.0+/-1.4

Tabelle: IZ2 - TGF Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.67+/-0.8	0.60+/-0.5	0.83+/-0.4	0.4+/-0.5	0.67+/-0.5	1.4+/-0.5
Tibia	1.0+/-0	0.17+/-0.4	1.0+/-0.6	1.0+/-0.6	1.17+/-0.7	1.0+/-1.0
MC	1.0+/-0.7	0.2+/-0.4	1.0+/-0.7	0.67+/-0.8	1.0+/-0.7	1.5+/-0.5
Radius	1.17+/-0.4	0.83+/-1.1	1.0+/-0	0.67+/-0.5	1.0+/-0	1.0+/-0.7

Tabelle: IZ2 - TGF OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.5+/-0.5	n. lesbar	1.0+/-0.6	0.33+/-0.5	n. lesbar	n. lesbar
Tibia	1.33+/-0.5	n. lesbar	1.5+/-0.8	0.5+/-0.5	n. lesbar	n. lesbar
MC	1.0+/-0.6	n. lesbar	0.83+/-0.4	0.67+/-0.5	n. lesbar	n. lesbar
Radius	1.5+/-0.8	n. lesbar	0.83+/-0.7	0.83+/-0.7	n. lesbar	n. lesbar

Tabelle: IZ3 - TGF Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.0+/-1.2	0.6+/-0.5	1.67+/-0.5	0.8+/-0.4	0.67+/-0.5	1.8+/-0.4
Tibia	1.5+/-1.0	0.33+/-0.5	1.67+/-0.8	1.17+/-0.9	0.83+/-0.4	0.6+/-0.5
MC	1.6+/-1.2	0.8+/-0.4	1.6+/-0.5	1.17+/-0.7	1.0+/-0.7	1.50+/-0.5
Radius	1.83+/-0.9	0.67+/-0.5	1.17+/-0.4	1.0+/-0	1.0+/-0	1.6+/-0.5

Tabelle: IZ3 - TGF OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	2.0+/-1.2	0.5+/-0.5	1.33+/-0.5	0.67+/-0.5	0.83+/-0.4	1.67+/-0.5
Tibia	2.0+/-1.0	1.0+/-0	1.67+/-0.8	0.67+/-0.5	1.33+/-0.5	n. lesbar
MC	1.17+/-0.7	0.4+/-0.5	1.33+/-0.8	0.33+/-0.5	0.5+/-0.5	n. lesbar
Radius	2.0+/-1.2	0.6+/-0.5	1.5+/-0.5	0.83+/-0.7	0.5+/-0.5	n. lesbar

Tabelle: IPC - TGF Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.5+/-0.5	1.33+/-0.5	1.75+/-0.5	1.67+/-1.1	1.0+/-0	2.0+/-0
Tibia	2.0+/-0	0.25+/-0.5	1.75+/-1.7	1.5+/-0.5	1.25+/-0.5	1.0+/-1.4
MC	2.33+/-0.5	0.67+/-0.5	2.67+/-0.5	1.0+/-0	1.33+/-0.5	2.5+/-2.1
Radius	1.0+/-0	1.67+/-0.5	2.0+/-0.8	1.67+/-1.1	0.5+/-0.7	2.0+/-0

Tabelle: IPC - TGF OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	2.25+/-1.5	0.75+/-0.5	2.25+/-0.9	0.75+/-0.9	1.5+/-1.0	2.0+/-0
Tibia	3.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.5+/-0.5	1.0+/-0
MC	1.0+/-0.8	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.67+/-1.1	2.25+/-1.2
Radius	2.25+/-1.5	1.0+/-0	1.75+/-1.5	1.75+/-1.5	1.0+/-0	2.25+/-0.9

Tabelle: Perichondrium - TGF Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	1	1	1	1	1
Tibia	1	0.25+/-0.5	0.75+/-0.5	1	1	0.5+/-0.7
MC	1	0.67+/-0.5	1	1	1	1
Radius	1	1	1	1	0.5+/-0.7	1

Tabelle: Perichondrium - TGF Op

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	0.5+/-0.7	1	0.5+/-0.5	0.75+/-0.5	1
Tibia	1	1	1	1	1	1
MC	0.75+/-0.5	1	1	1	1	1
Radius	1	1	1	1	1	1

FZ1 - FGF2 Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	0.8+/-0.4	1	1	1	1
Tibia	1	1	0.67+/-0.5	1	1	1
MC	1	1	1	1	1	1
Radius	1	1	1	1	1	1

Tabelle: FZ1 - FGF2 OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.2+/-0	1	1	1	1	1
Tibia	1	1	1	1	1	1

MC	1	1	1	1	1	1
Radius	1	1	1	1	1	1

Tabelle: FZ2 - FGF Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	0.60+/-0.5	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	1	0.67+/-0.5
Tibia	0.80+/-0.4	0.5+/-0.5	0.67+/-0.5	1	1	1
MC	0.80+/-0.4	1	0.80+/-0.4	0.83+/-0.4	0.80+/-0.4	1
Radius	0.67+/-0.5	0.83+/-0.4	1	0.67+/-0.5	1	1

Tabelle: FZ2 - FGF OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	1	0.67+/-0.5	1	0.83+/-0.4	0.67+/-0.5
Tibia	1	0.33+/-0.5	0.83+/-0.4	0.83+/-0.4	1	1
MC	1	1	0.8+/-0.4	0.8+/-0.4	0.83+/-0.4	1
Radius	1	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	0.60+/-0.5	0.83+/-0.4

Tabelle: FZ3 - FGF Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	0.80+/-0.4	1.0+/-0	0.83+/-0.4	1.0+/-0	1
Tibia	0.80+/-0.4	1	0.83+/-0.4	1.0+/-0	1	1
MC	1	1	1.0+/-0	1	0.8+/-0.4	1
Radius	1	1	1	1.0+/-0	1.0+/-0	1

Tabelle: FZ3 - FGF OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	1	1	1	1	1
Tibia	1	1	1	1	1	1
MC	1	1	1	1	1	1
Radius	1	1	1	1	1	0.8+/-0.4

Tabelle: IZI - FGF2 Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.5+/-0.5	0.8+/-0.4	2.17+/-1.1	1.67+/-1.0	1.5+/-0.5	1.33+/-0.5
Tibia	1.2+/-0.4	1.0+/-0	1.17+/-0.9	1.0+/-0	1.83+/-0.7	1.33+/-0.5
MC	1.6+/-0.5	1.4+/-0.8	1.8+/-0.8	1.17+/-0.4	1.8+/-0.8	1.33+/-0.5
Radius	1.5+/-0.5	1.0+/-0	1.83+/-0.7	1.17+/-0.4	1.67+/-0.5	1.5+/-0.8

Tabelle: IZI - FGF2 OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.83+/-0.7	1.0+/-0	1.83+/-0.7	1.2+/-0.4	1.83+/-0.9	1.17+/-0.4
Tibia	2.67+/-1.1	1.0+/-0	2.17+/-0.7	1.83+/-0.7	1.33+/-0.8	1.33+/-0.5
MC	1.5+/-0.8	1.2+/-0.4	1.2+/-0.4	1.2+/-0.4	1.5+/-0.8	n. lesbar
Radius	2.17+/-0.9	1.5+/-0.5	1.67+/-0.8	2.3+/-0.8	1.8+/-0.8	n. lesbar

Tabelle: JZ2 - FGF2 Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	0.6	0.67	1	1.17	0.83
Tibia	0.8	0.5	0.83	1	1.17	1
MC	0.8	1	0.8	1	1	1.17
Radius	0.67	1.17	0.67	0.67	0.67	1

Tabelle: JZ2 - FGF2 OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.0+/-0	1.0+/-0	0.67+/-0.5	1.0+/-0	1.33+/-1.0	0.67+/-0.5
Tibia	1.67+/-1.1	0.33+/-0.5	1.17+/-0.7	1.17+/-0.7	1.0+/-0	1.0+/-0
MC	1.17+/-0.4	1.0+/-0	0.8+/-0.4	0.8+/-0.4	1.0+/-0.6	1.2+/-0.4
Radius	1.17+/-0.4	0.67+/-0.5	0.83+/-0.7	0.83+/-0.7	1.0+/-1	1.5+/-1.2

Tabelle: IZ3 - FGF2 Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.5+/-0.8	1.2+/-0.8	1.17+/-0.4	1.0+/-0.6	1.0+/-0	1.3+/-0.5
Tibia	1.2+/-1.0	1.0+/-0	1.5+/-1.0	1.0+/-0	1.5+/-0.5	1.3+/-0.5
MC	1.4+/-0.5	1.2+/-0.4	2.0+/-1	1.0+/-0	1.0+/-0.7	1.17+/-0.4
Radius	1.33+/-1.0	1.67+/-0.8	1.17+/-0.7	1.5+/-0.5	1.0+/-1.0	1.5+/-0.8

Tabelle: IZ3 - FGF2 OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.67+/-0.8	1.0+/-0	1.5+/-0.5	1.0+/-0	1.5+/-0.8	1.33+/-0.5
Tibia	2.0+/-1	1.0+/-0	2.17+/-1.4	1.5+/-0.5	1.33+/-0.5	1.33+/-0.5
MC	1.5+/-0.8	1.4+/-0.5	1.2+/-0.4	1.0+/-0	1.0+/-0	1.6+/-0.8
Radius	1.67+/-0.8	1.67+/-0.8	1.33+/-0.5	1.33+/-0.9	1.2+/-1.0	2.0+/-1.0

Tabelle: IPC - FGF2 Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	2.5+/-1.0	2.0+/-0	2.25+/-1.2	1.75+/-0.5	2.5+/-0.5	1.75+/-0.9
Tibia	2.0+/-1.7	2.0+/-1.4	1.75+/-1.7	1.5+/-0.5	2.0+/-0	1.5+/-0.7
MC	1.33+/-0.5	1.67+/-1.1	2.33+/-0.5	2.0+/-0	2.0+/-0	2.0+/-1.4
Radius	1.75+/-0.5	2.25+/-0.5	2.5+/-0.5	1.5+/-0.7	2.0+/-1.4	2.0+/-0

Tabelle: IPC - FGF2 OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	2.5+/-1.0	3.0+/-1.0	2.25+/-0.9	1.33+/-0.5	2.25+/-0.5	2.33+/-0.5
Tibia	4.0+/-0	1.0+/-0	2.5+/-0.5	1.25+/-0.5	1.75+/-0.9	1.5+/-0.7
MC	1.5+/-1.0	2.33+/-0.5	1.67+/-1.5	1.67+/-1.1	2.33+/-0.5	3.0+/-0
Radius	2.5+/-0.5	2.5+/-0.7	2.25+/-0.9	2.25+/-1.2	2.33+/-1.5	2.33+/-1.1

Tabelle: PC - FGF2 Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1
Tibia	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	0.75+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1
MC	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1
Radius	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1

Tabelle: PC - FGF2 OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1
Tibia	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1
MC	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	0.06+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1
Radius	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1	1.0+/-0.1

Tabelle: FZ1 - IHH Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	1	0.3+/-0.5	1	1	1
Tibia	0.67+/-0.5	0.8+/-0.4	0.3+/-0.5	0.8+/-0.4	1	1
MC	0.67+/-0.5	1	0.6+/-0.5	1	1	0.8+/-0.4
Radius	0.83+/-0.4	0.5+/-0.5	1	1	1	1

Tabelle: FZ1 - IHH OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	1	0.8+/-0.4	1	1	0.67+/-0.5
Tibia	1	1	0.8+/-0.4	1	1	1
MC	1	1	0.5+/-0.5	0.83+/-0.4	1	0.8+/-0.4
Radius	1	1	0.67+/-0.5	1	1	1

Tabelle: FZ2 - IHH Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.67+/-0.5	0.60+/-0.5	0.17+/-0.4	1.0+/-0	1	0.83+/-0.4
Tibia	0.33+/-0.5	1	0.17+/-0.4	0.4+/-0.5	1	0.67+/-0.5

MC	0.33+/-0.5	1	0.4+/-0.5	0.83+/-0.4	1	0.60+/-0.5
Radius	0.83+/-0.4	1	0.17+/-0.4	0.80+/-0.4	1	0.67+/-0.5

Tabelle: FZ2 - IHH OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.83+/-0.4	1	0.2+/-0.4	0.83+/-0.4	1	0.67+/-0.5
Tibia	1.0+/-0	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	0.83+/-0.4	1	0.67+/-0.5
MC	0.67+/-0.5	n. lesbar	0.17+/-0.4	0.5+/-0.5	1	0.4+/-0.5
Radius	0.83+/-0.4	0.80+/-0.4	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	1	0.67+/-0.5

Tabelle: FZ3 - IHH Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.83+/-0.4	1	0.5+/-0.5	1	1	1
Tibia	0.33+/-0.5	1	0.5+/-0.5	0.6+/-0.5	1	1
MC	0.67+/-0	1	0.6+/-0.5	0.83+/-0.4	1	1
Radius	1	1	0.33+/-0.5	1	1	0.83+/-0.4

Tabelle: FZ3 - IHH OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	1	0.6+/-0.5	1	1	0.67+/-0.5
Tibia	1	1	0.83+/-0.4	1	1	1
MC	1	1	0.5+/-0.5	1	1	1
Radius	1	1	0.83+/-0.4	0.83+/-0.4	1	1

Tabelle: IZ1 - IHH Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.0+/-0	1.0+/-0	0.33+/-0.5	1.17+/-0.4	1.17+/-0.4	1.17+/-0.4
Tibia	0.67+/-0.5	0.8+/-0.4	0.33+/-0.5	0.8+/-0.4	1.0+/-0	1.83+/-0.9
MC	0.67+/-0.5	1.0+/-0	0.80+/-0.8	1.0+/-0	1.6+/-0.5	1.2+/-0.4
Radius	1.0+/-0	1.0+/-0	0.5+/-0.5	1.0+/-0	1.33+/-0.5	1.0+/-0.6

Tabelle: JZ1 - IHH OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.17+/-0.4	1.0+/-0	0.8+/-0.4	1.17+/-0.4	1.5+/-0.5	0.67+/-0.5
Tibia	1.0+/-0	1.33+/-0.5	0.83+/-0.4	1.33+/-0.5	1.33+/-0.5	1.33+/-0.5
MC	1.0+/-0	1.0+/-0	0.5+/-0.5	0.83+/-0.4	1.17+/-0.4	1.33+/-0.8
Radius	1.5+/-0.5	1.5+/-0.5	0.6+/-0.5	1.33+/-0.5	1.33+/-0.5	1.67+/-1.0

Tabelle: IZ2 - IHH Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.67+/-0.5	0.8+/-0.8	0.17+/-0.4	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0.6
Tibia	0.33+/-0.5	1.0+/-0	0.17+/-0.4	0.40+/-0.5	1.0+/-0	1.33+/-1.0
MC	0.33+/-0.5	1.0+/-0	0.40+/-0.5	0.83+/-4	1.0+/-0	1.0+/-0.7
Radius	0.83+/-0.4	1.0+/-0	0.17+/-0.4	1.20+/-0.8	1.0+/-0	1.0+/-1.1

Tabelle: IZ2 - IHH OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.17+/-0.9	1.0+/-0	0.2+/-0	0.83+/-0.4	1.0+/-0	0.67+/-0.8
Tibia	1.0+/-1.0	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	1.0+/-0.5	1.0+/-0	0.67+/-0.5
MC	0.67+/-0.5	0.75+/-0.5	0.17+/-0	0.5+/-0.5	1.17+/-0.4	1.67+/-0.8
Radius	1.17+/-0.7	0.8+/-0.4	0.6+/-0.5	0.67+/-0.5	1.5+/-0.8	1.0+/-0.8

Tabelle: IZ3 - IHH Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.83+/-0.4	1.0+/-0	0.5+/-0.5	1.0+/-1	1.0+/-0	1.33+/-0.5
Tibia	0.67+/-1.1	1.0+/-0	0.5+/-0.5	0.8+/-0.8	1.17+/-0.4	1.67+/-1.0
MC	0.67+/-0.5	1.0+/-0	0.6+/-0.5	0.83+/-0.4	1.0+/-0	1.2+/-0.4
Radius	1.33+/-0.5	1.3+/-0.5	0.33+/-0.5	1.8+/-0.4	1.33+/-0.5	1.17+/-0.9

Tabelle: IZ3 - IHH OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.67+/-0.5	n. lesbar	0.6+/-0.5	1.67+/-0.5	1.17+/-0.4	0.67+/-0.5
Tibia	1.67+/-0.5	n. lesbar	0.83+/-0.4	1.33+/-0.5	1.17+/-0.4	1.33+/-0.5
MC	1.33+/-0.5	n. lesbar	0.5+/-0.5	1.0+/-0	1.0+/-0	1.5+/-0.8
Radius	1.33+/-0.5	n. lesbar	0.83+/-0.4	0.83+/-0.4	1.33+/-0.5	1.83+/-0.9

Tabelle: IPC - IHH Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.5+/-0.5	2.33+/-0.5	1.5+/-1.0	1.75+/-0.9	2.25+/-1.2	2.5+/-1.2
Tibia	0.5+/-0.7	1.5+/-0.7	1.33+/-1.5	1.0+/-0	1.25+/-0.5	2.0+/-0.8
MC	1.0+/-0	1.5+/-0.7	2.0+/-1.0	1.67+/-0.5	1.67+/-0.5	1.67+/-0.5
Radius	1.75+/-0.9	2.0+/-0.8	1.25+/-0.5	1.67+/-0.5	2.5+/-2.1	1.5+/-1.0

Tabelle: IPC - IHH OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	2.25+/-0.5	1.75+/-0.9	1.67+/-0.5	2.33+/-1.1	3.0+/-1.1	1.67+/-0.5
Tibia	3.0+/-0	1.5+/-0.7	1.75+/-0.5	1.0+/-0	1.5+/-0.5	1.50+/-0.7
MC	1.67+/-0.5	1.0+/-0	0.67+/-0.5	1.5+/-0.5	2.0+/-1.0	1.5+/-2.1
Radius	2.5+/-0.5	2.0+/-0	1.5+/-0.5	1.75+/-0.9	2.25+/-1.2	1.75+/-1.5

Tabelle: Perichondrium - IHH Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0
Tibia	0.5+/-0.7	1.0+/-0	0.67+/-0.5	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0
MC	0.5+/-0.7	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0
Radius	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0

Tabelle: Perichondrium - IHH OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0
Tibia	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0
MC	1.0+/-0	1.0+/-0	0.67+/-0.5	1.0+/-0	1.0+/-0	0.5+/-0.7
Radius	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	0.75+/-0.5

Tabelle: FZI - PTHrP Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.83+/-0.4	0.8+/-0.4	0.83+/-0.4	1	1	1
Tibia	0.6+/-0.5	0.0+/-0	0.17+/-0.4	0.4+/-0.5	1	1
MC	1	0.8+/-0.4	0.5+/-0.5	1	1	0.4+/-0.5
Radius	0.33+/-0.5	0.6+/-0.5	0.67+/-0.5	1	1	1

Tabelle: FZI - PTHrP OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	0.5+/-0.5	0.5+/-0.5	1	1	1
Tibia	1	1	0.83+/-0.5	1	1	1
MC	1	1	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	0.8+/-0.4
Radius	1	0.83+/-0.4	1	1	1	1

Tabelle: FZ2 - PTHrP Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.33+/-0.2	0.6+/-0.2	0.66+/-0.2	0.5+/-0.2	0.66+/-0.2	0.8+/-0.2
Tibia	0.2+/-0.2	0.16+/-0.2	0.33+/-0.2	0.2+/-0.2	0.5+/-0.2	0.66+/-0.2
MC	0.6+/-0.2	1.0+/-0.2	0.5+/-0.2	0.6+/-0.2	0.8+/-0.2	0.4+/-0.2
Radius	0.66+/-0.2	0.66+/-0.2	0+/-0.2	0.5+/-0.2	0.66+/-0.2	0.5+/-0.2

Tabelle: FZ2 - PTHrP OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.6+/-0.5	0.5+/-0.5	0.33+/-0.5	0.5+/-0.5	0.83+/-0.4	0.67+/-0.5
Tibia	0.33+/-0.5	0.33+/-0.5	0.67+/-0.5	0.8+/-0.4	0.5+/-0.5	0.67+/-0.5

MC	0.5+/-0.5	0.8+/-0.4	0.17+/-0.4	0.33+/-0.5	0.33+/-0.5	0.6+/-0.5
Radius	0.83+/-0.4	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5

Tabelle: FZ3 - PTHrP Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.5+/-0.5	1.0+/-0	0.67+/-0.5	1.0+/-0	0.83+/-0.4	1.0+/-0
Tibia	0.2+/-0.4	0.33+/-0.5	0.5+/-0.5	1.0+/-0	0.83+/-0.4	1.0+/-0
MC	1.0+/-0	1.0+/-0	0.5+/-0.5	1.0+/-0	1.0+/-0	0.80+/-0.4
Radius	1.0+/-0	1.0+/-0	0.5+/-0.5	0.83+/-0.4	1.0+/-0	0.3+/-0.5

Tabelle: FZ3 - PTHrP OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.2+/-0.4	0.83+/-0.4	0.33+/-0.5	0.67+/-0.5	0.83+/-0.4	1
Tibia	1	1	0.5+/-0.5	0.80+/-0.4	1.0+/-0	0.67+/-0.5
MC	1	0.8+/-0.4	0.5+/-0.5	0.83+/-0.4	0.83+/-0.4	1
Radius	1	0.6+/-0.8	0.83+/-0.4	0.83+/-0.4	0.83+/-0.4	1

Tabelle: IZI - PTHrP Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.83+/-0.4	0.6+/-0.5	0.83+/-0.4	1.17+/-0.4	1.17+/-0.4	1.20+/-0.4
Tibia	0.6+/-0.5	0+/-0	0.17+/-0.4	0.4+/-0.5	1.17+/-0.4	1.17+/-0.4
MC	1.0+/-0	0.8+/-0.4	0.5+/-0.5	1.0+/-0	1.2+/-0.4	0.4+/-0.5
Radius	1.67+/-0.8	0.83+/-0.7	1.0+/-1.0	1.17+/-0.4	1.67+/-0.5	0.33+/-0.5

Tabelle: IZI - PTHrP OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.6+/-0.5	0.5+/-0.5	0.5+/-0.5	1.67+/-0.8	1.17+/-0.4	1.0+/-0
Tibia	1.33+/-0.5	1.0+/-0	0.83+/-0.4	1.6+/-0.8	1.17+/-0.4	1.0+/-0
MC	1.67+/-0.5	1.0+/-0	0.67+/-0.5	0.67+/-0.5	1.0+/-0.8	1.4+/-0.1
Radius	1.0+/-0	0.83+/-0.4	1.0+/-0	1.83+/-0.7	1.5+/-0.8	1.5+/-0.8

Tabelle: IZ2 - PTHrP Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.33+/-0.5	0.6+/-0.5	0.67+/-0.5	0.5+/-0.5	0.67+/-0.5	0.8+/-0.4
Tibia	0.2+/-0.4	0.17+/-0.4	0.33+/-0.5	0.2+/-0.4	0.5+/-0.5	0.83+/-0.7
MC	0.6+/-0.5	1.0+/-0	0.5+/-0.5	0.8+/-0.8	0.8+/-0.4	0.4+/-0.5
Radius	0.8+/-0.7	0.83+/-0.7	0+/-0	0.67+/-0.8	0.67+/-0.5	0.5+/-0.5

Tabelle: IZ2 - PTHrP OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	n. lesbar	0.5+/-0.5	0.33+/-0.5	0.67+/-0.8	0.83+/-0.4	0.67+/-0.5
Tibia	n. lesbar	0.33+/-0.5	0.67+/-0.5	n. lesbar	0.5+/-0.5	0.67+/-0.5
MC	n. lesbar	0.8+/-0.8	0.17+/-0.4	0.33+/-0.5	0.33+/-0.5	0.8+/-0.8
Radius	n. lesbar	0.6+/-0.5	0.67+/-0.5	0.6+/-0.5	1.17+/-1.1	1.17+/-1.1

Tabelle: IZ3 - PTHrP Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	0.66+/-0.2	1.4+/-0.2	0.66+/-0.2	1.0+/-0.2	0.83+/-0.2	0.8+/-0.2
Tibia	0.6+/-0.2	0.33+/-0.2	0.83+/-0.2	1.0+/-0.2	1.0+/-0.2	1.33+/-0.2
MC	1.2+/-0.2	1.4+/-0.2	0.5+/-0.2	1.2+/-0.2	1.0+/-0.2	1.0+/-0.2
Radius	1.33+/-0.2	1.33+/-0.2	0.5+/-0.2	1.16+/-0.2	1.33+/-0.3	0.33+/-0.2

Tabelle: IZ3 - PTHrP OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.20+/-0.8	1.0+/-0.6	0.33+/-0.5	0.83+/-0.7	1.0+/-0.6	1.17+/-0.4
Tibia	1.33+/-0.5	1.3+/-0.5	0.5+/-0.5	1.6+/-0.5	1..0+/-0	0.6+/-0.5
MC	1.33+/-0.5	1.0+/-0.7	0.5+/-0.5	0.83+/-0.4	1.0+/-0.6	1.2+/-0.4
Radius	1.1+/-0.4	1.0+/-0.6	0.83+/-0.4	1.5+/-0.8	1.33+/-1.0	1.17+/-0.4

Tabelle: IPC - PTHrP Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.25+/-0.5	2.0+/-0	1.0+/-0	1.75+/-0.5	2.5+/-0.5	1.0+/-0
Tibia	0.33+/-0.5	0.75+/-0.5	1.0+/-1.1	1.33+/-1.5	1.25+/-0.5	1.0+/-0
MC	0.67+/-0.5	1.33+/-0.5	1.0+/-0	1.33+/-0.5	1.33+/-0.5	1.0+/-0
Radius	1.33+/-0.5	2.5+/-0.5	1.0+/-0	1.0+/-1.0	2.50+/-0.7	1.0+/-0

Tabelle: IPC - PTHrP OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1.5+/-0.5	2.33+/-1.1	1.0+/-0.8	1.25+/-1.2	2.0+/-1.1	1.33+/-0.5
Tibia	3.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	1.67+/-0.5	1.5+/-1.0	2.5+/-0.7
MC	1.25+/-0.9	1.0+/-0	1.0+/-0	1.0+/-0	2.0+/-1.1	2.0+/-1.4
Radius	1.25+/-0.5	1.0+/-1.0	1.0+/-0	2.0+/-1.4	1.33+/-0.5	1.75+/-0.9

Tabelle: Perichondrium PTHrP Kontrolle

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	1	1	1	1	1
Tibia	0.33+/-0.5	0.75+/-0.5	0.5+/-0.5	0.67+/-0.5	1	1
MC	0.67+/-0.5	1	1	1	1	1
Radius	1	1	1	0.67+/-0.5	1	1

Tabelle: Perichondrium PTHrP OP

Variable	2 days	6 days	10 days	14 days	18 days	21 days
MT	1	1	0.75+/-0.5	0.75+/-0.5	1	1
Tibia	1	1	1	1	1	0.5+/-0.7
MC	0.75+/-0.5	1	1	1	1	1
Radius	1	0.67+/-0.5	1	1	1	1

7 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war die Beantwortung folgender Fragestellungen:

- Welches sind die durch eine PTE auf Zellebene ausgelösten Mechanismen?
 - Beeinflusst die PTE den Feedbackmechanismus von Ihh/PTHrP in der Wachstumsfuge gesunder, im Wachstum befindlicher Lämmer?
 - Wird durch Elevation des Perichondriums der „Crosstalk“ zwischen der GP und dem Perichondrium unterbrochen und in der Folge Ihh, PTHrP/PTHR, TGF und FGF in den Chondrozyten aufreguliert?
 - Unterschiede bezüglich der OP-Lokalisation?
- Ist die PTE als therapeutische Methode wirksam?

Nachfolgend soll im Zusammenhang mit obenstehend aufgeworfener Fragen der Aufbau der Studie, die Ergebnisse und mögliche Zukunftsszenarien und -visionen diskutiert werden.

7.1 Versuchsanordnung

12 + 10 Lämmer dienten dieser Arbeit als Studienobjekte, da sie eine den Pferden, bzw. Fohlen (und auch Menschen) vergleichbare Knochenstruktur und Wachstumsmechanismen aufweisen. Zudem sind Schafe kostengünstig, einfach in der Handhabung und die Institutsstallungen bieten ideale Voraussetzungen für eine tierschutzkonforme Haltung. Um aussagekräftige statistische Ergebnisse zu erlangen, bedarf es einer möglichst grossen Versuchsgruppe, aus ethischen, Tierschutz- und Kostengründen wurde versucht ein Minimum an Tieren für die Tierversuche einzusetzen. Man hat sich auf 2 Tiere pro Versuchsgruppe und Schlachtintervall geeinigt, entsprechend erlangte man durch Farbintensitätsbewertung an drei Messpunkten und in je drei Zonen, bzw. Längenmessungen an vier Lokalisationen pro Schlachtzeitpunkt, neun Bewertungen und acht Messungen – dies für alle drei relevanten Zonen der GP. Mit der Auswahl von vier OP-Lokalisationen, jeweils zwei an der Vorder- und Hinterextremität und je Versuchsgruppe 1 x links, 1 x rechts, der Schnittführung axial und sagittal, wurde ein grosses Spektrum an eventuell beeinflussenden Faktoren (durch Tier und Operateur) relativiert. Durch das Verfolgen der Resultate über einen Zeitraum von rund 3 Wochen konnte ein zusätzlicher, wichtiger Aspekt untersucht werden und gleichzeitig die Aussagekraft erhöht werden.

Eine grössere Versuchstiergruppe hätte wahrscheinlich zu einer kleineren Variation geführt, bzw. die statistische Signifikanz wäre vielleicht höher gewesen – anhand der gewonnenen Ergebnisse lassen sich aber bereits sehr deutliche Tendenzen aufweisen. Die anfangs

aufgestellte Hypothese, dass PTE zu einer Beeinflussung von Signalkaskaden wie Ihh-PTHrP/PTHrP führt, scheint bestätigt. Nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte, dass Signalfaktoren systemisch vom OP-Gebiet in die Kontrollgliedmasse oder umgekehrt gelangen und dortige Ergebnisse beeinflussen. Dies zu untersuchen könnte ein Aspekt einer Folgestudie sein.

7.2 Die PTE als Operations- & Versuchsmethode

Für die vorliegende Studie wurde die PTE als Operationsmethode gewählt, weil die Operateure damit am meisten Erfahrung hatten und somit ein routiniertes und relativ standardisiertes Vorgehen vorausgesetzt werden konnte. Da die PTE im Hause langjährig praktiziert wird, erlaubt dies den direkten Vergleich zwischen empirisch gewonnen Eindrücken und statistischen Ergebnissen. Des weiteren erhärtet eine inzwischen durchgeführte klinische Studie von Auer et al. den Verdacht, dass jegliche chirurgische Manipulationen des periarticulären Perichondriums einer noch nicht ossifizierten GP zu Wachstumsacceleration führen können (Publikation in Vorbereitung).

Literaturrecherchen haben ergeben, dass auf „Periosteal Stripping“ beruhende Wachstumsstimulation, bisher weder auf molekularbiologischer Ebene, noch mittels immunhistochemischen Techniken untersucht worden war.

7.3 Wahl der OP-Lokalisation & Technik

Im Vergleich zur Immunhistochemie liessen sich die Reaktionen der Signaltransduktoren, sogar auf genetischer Ebene, mittels PCR zwar detaillierter quantifizieren, die technische Durchführung stellt jedoch eine grosse Herausforderung dar. Anders als beim angewendeten Verfahren liessen sich, ausser mit Laser-Concept-Dissection (Duesterdik, Frisbie, Thesis CSU, Colorado, USA), mittels PCR die Ergebnisse nicht für einzelne GP-Zonen erfassen, was der semiquantitativen, immunhistochemischen Methode den Vorrang gab.

Um möglichst viele statistisch verwertbare Daten zu generieren und trotzdem dem ethischen Bestreben, nur ein Minimum an Tieren zu opfern und Leiden zu minimieren, gerecht zu werden, wurde jedes Tier an mehreren Lokalisationen operiert. Entscheidend für die Auswahl der zu untersuchenden Wachstumsfugen waren Reife und Praktikabilität, wobei der Epiphysenfugenschluss je nach Schafrasse, Individuum und entsprechend auch Untersuchungsmethode und Literatur einer grossen Variationsbreite unterliegt (Habermehl 1975). Da die untersuchten Signaltransduktionsmechanismen nicht nur auf der inter- und intrazellulären Ebene durch Diffusion o.ä. stattfinden, interessierte neben der GP auch das

perichondrale Periost. Über dieses findet die vaskuläre Versorgung des gesamten Knochens und der GP statt. Nebst der Zufuhr von Nährstoffen und der Oxygenierung des Gewebes ist das Periost aber auch an sämtlichen Schritten des Knochenauf- und Umbaus beteiligt, weshalb Konzentrationsverläufe von Signalmolekülen im perichondralen Periost, bzw. Perichondrium durchaus von Interesse waren – leider erwies sich die gewählte Probenverarbeitungsmethode hierfür als suboptimal, da das Perichondrium bei der Prozessierung oft beschädigt wurde und somit einer statistischen Auswertung nicht immer stand halten konnte, auch wenn adspektorisch deutliche Reaktionen inklusive Hypertrophie auszumachen waren.

Bei der Operation und der späteren Probenentnahme fiel durchwegs ein kleines Gefäss auf, welches vom lateralen Periost in Richtung entsprechende GP einspross. Eine systematische Identifizierung dieses Gefässes und dessen Bedeutung betreffend der Regulation des Knochenlängenwachstums sollten unbedingt Inhalt weiterführender Studien sein. Im Hause sind bereits Operationsversuche mit alleiniger Manipulation und/oder Transsektion dieses Gefässes geplant, randomisierte Resultate über die Auswirkung dieser Intervention sind noch ausstehend.

7.4 Kommentare zum Schmerzmanagement

Aus ethischer und tierschützerischer Sicht war die intra- und postoperative Abdeckung der Schafe mit potenten Analgetika Pflicht. Wie bereits erwähnt, wurde auf den Einsatz von NSAIA's verzichtet, da diese nachweislich in zahlreichen Studien einen messbaren Effekt auf das Knochenwachstum und die Frakturheilung ausüben; stattdessen wurde Buprenorphin (Temgesic®, Essex Chemie AG, Lucerne, Switzerland), ein Opioid, verabreicht. Bis dato existieren keine der Autorin bekannte Studien, welche Opioiden einen Effekt bezüglich der Regulation des Knochenlängenwachstums zusprechen – trotzdem kann eine minime Beeinflussung nicht absolut ausgeschlossen werden. Dasselbe gilt für alle anderen verabreichten Medikamente wie Antibiotika und Narkotika.

Die Schafe zeigten postoperativ keine äusserlich sichtbaren Anzeichen von Schmerzen wie Lahmheit, Bewegungsunlust, reduzierter Appetit oder Ähnliches.

7.5 Probenentnahme & -Bearbeitung

Die Qualität der mit diversen Markern angefärbten histologischen Schnitte war nicht immer zufriedenstellend. Besonders diejenigen Schnitte, die auf MMP13 untersucht wurden, wiesen auf Grund der speziellen immunhistochemischen Verarbeitungsmethode fast durchgehend

Qualitätsmängel auf. Ausserdem zeigte sich, je später der Zeitpunkt der Dünnschnittherstellung, desto schlechter war die Qualität. Wahrscheinlich ist dies Folge der Alterung der Paraffinblöcke, welche mit der Zeit immer trockener und bröcklicher wurden, was die Dünnschnittherstellung erheblich erschwerte. Am Ende betrug die Zeitspanne zwischen der Probenentnahme und dem Endverarbeitungsdatum 1.5 bis fast 2 Jahre, weshalb innerhalb der letzten Schnittserien markant mehr Histoschnitte verworfen werden mussten. War ein histologischer Schnitt in mehr als nur einer Zone nicht beurteilbar, schied er aus. Ausgesonderte Schnitte wurden mit höchster Sorgfalt neu hergestellt und, sofern diese die Qualitätsansprüche erfüllten, ersetzt. Falls nach zwei Versuchen kein befriedigendes Ergebnis vorlag, die GP bereits auf Stufe des Histoblocks schlecht dargestellt oder zerrissen war, wurde ganz auf die entsprechende Auswertung der Knochenprobe verzichtet.

Die Immunhistologie ist eine wissenschaftlich etablierte diagnostische Methode. Die Verarbeitung der histologischen Schnitte, insbesondere die Farbentwicklung unter Sichtkontrolle, muss durch technisch und morphologisch erfahrenes Personal erfolgen. Dieses arbeitet mit Positivkontrollen und unspezifischen Anfärbungen, um die natürliche Varianz möglichst klein zu halten. Die Proben dieser Studie wurden alle durch dieselben zwei Personen verarbeitet, wobei die Anfärbung stets durch die erfahrene Pathologin Dr. med. vet. Monika Hilbe erfolgte. Somit kann weitgehend von standardisierten, Bedingungen ausgegangen werden - trotzdem können minime Verfälschungen aufgrund äusserer oder „biologischer“ Faktoren nicht ganz ausgeschlossen werden.

7.6 Mikroskopische Beurteilung

Alle immunhistologischen Probenbeurteilungen fanden serienweise, am selben Mikroskop, durch eine einzige Person (die Autorin), statt. Ebenso verhielt es sich mit den GP-Längenmessungen, wobei diese durch Dr. med. vet. F. von Wedel durchgeführt wurden. Der individuelle Ermessensspielraum sowie zeitbedingte Abweichungen wurden durch Stichproben, ausgeführt durch eine weitere unabhängige Person, möglichst klein gehalten. Die histologischen Proben wurden nur beurteilt, wenn sie den auferlegten Qualitätsanforderungen stand hielten und das Scoring wurde so schementreu wie möglich durchgeführt, wobei die beurteilende Person nicht wusste, ob es sich um operierte oder Kontrollproben handelte.

7.7 Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Studie hat erstmals durch chirurgische Manipulation ausgelöste, molekularbiologische Prozesse innerhalb der noch im Wachstum befindlichen GP immunhistochemisch untersucht. Es konnte aufgezeigt werden, dass die PTE durchaus involvierte Signaltransduktionsmechanismen beeinflusst; z.T. in statistisch relevantem Ausmass, z.T. nur als beobachtete Tendenz. Tatsächlich konnte nach erfolgter PTE zwei Tage post Operationem initial eine Aufregulation aller untersuchter Signalmoleküle beobachtet werden. Entsprechend vorangegangener Studien an knock-out Mäusen (Chung, Lanske et al. 1998; Chung, Schipani et al. 2001; Kronenberg and Chung 2001) und Embryonen (Vortkamp, Lee et al. 1996) erfolgte physiologischerweise während des Wachstums eine primäre Hochregulation von Ihh v.a. im Bereich der Reservezone und der hypertrophen Zone, wo die Chondrozytendifferenzierung induziert wird. Dies führte in der vorliegenden Studie zu einem PTHrP-Anstieg, insbesondere im Perichondrium, während PTHR in allen Zonen anstieg. Die jedoch höchsten PTHR-Scores stellte man im Perichondrium und der hypertrophen Zone fest. Die Wachstumsfaktoren FGF₂ und TGF_β die innerhalb der Ihh-PTHrP-Kaskade hauptsächlich als Signaltransduktoren fungieren, stiegen ebenfalls signifikant an, wobei FGF in erhöhter Konzentration in der Reservezone und TGF_β im Perichondrium nachgewiesen wurde.

Die durchgeführten GP-Gesamtlängenmessungen ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede, jedoch konnten signifikant negativ korrelierende Messerwerte zwischen den unterschiedlichen Wachstumszonen (der Reserve- und der Proliferations-/hypertrophen Zone) nachgewiesen werden. Das heisst, dass je nach Zytokinfreisetzung die eine oder andere GP-Zone vermehrt aktiviert wurde. Die Komplexität und biologische Variabilität der Resultate erlaubte jedoch keine statistische Aussagekraft. Trotzdem unterstützten die gemachten Erkenntnisse die schon von anderen Autoren (van der Eerden, Karperien et al. 2000; van der Eerden, Karperien et al. 2003) geäusserte These eines negativen Feedback-Loops. Das bedeutet, dass bei einer relativ dicken proliferativen Zone die hypertrophe Zone deutlich schmaler war.

Erstaunlich war der in dieser Studie erstmals aufgezeigte ondulierende Konzentrationsverlauf der immunhistologisch untersuchten Moleküle, welcher in der bisherigen Literatur in dieser Form nie beschrieben wurde. Da die Probenaufbereitung immer von der selben erfahrenen Person und in entsprechenden Serien ausgeführt wurde, muss es sich hierbei um ein reales Phänomen handeln. Gehen wir von der These eines negativen Feedback-Loops als Regulator des Knochenlängenwachstums aus, scheint ein ondulierendes Verlaufsmuster der

Signaltransduktorenexpression zudem höchst plausibel und physiologisch sinnvoll, um überschüssige Effekte zu vermeiden. Der ebenfalls oft parallel ondulierende Konzentrationsverlauf innerhalb der Kontrollproben lässt sich insofern erklären, als dass es sich einerseits um das kontralaterale Bein desselben Tieres handelt und somit auch dort allenfalls systemische Einflüsse nicht ausgeschlossen werden können, andererseits wurden in dieser Arbeit durchwegs unreife GP's untersucht, in welchen kontinuierlich Ossifikationsprozesse physiologisch stattfinden. Da die Moleküle in durchwegs tieferer Konzentration nachgewiesen wurden, scheinen diese Umbau- und Differenzierungsvorgänge in milderem Ausmasse abzulaufen.

Einige Marker, insbesondere Ihh und PTHR, erreichten das Punctum Maximum am zweiten Tag post OP, d.h. zum Zeitpunkt der ersten Messung; andere stiegen gegen Ende der Messreihe an – eine Folgestudie könnte dieser Tatsache durch ein früher und länger gewähltes Zeitintervall Rechnung tragen. Zudem muss davon ausgegangen werden, dass der unterschiedliche Reifegrad der operierten Epiphysenfugen die durch PTE ausgelösten Mechanismen beeinflussen kann - auch dies ist ein Parameter, welcher in zukünftigen Studien vermehrt Beachtung finden sollte.

8 Schlusswort

Die hier dokumentierte Studie hat bestätigt, dass die PTE Signaltransduktionskaskaden innerhalb der Wachstumsfuge nachweislich beeinflusst. Wenn die chirurgische Intervention zum richtigen Zeitpunkt, das heisst vor Epiphysenfugenschluss angewandt wird, kann das korrektive Knochenlängenwachstum stimuliert werden. Es stellt sich heute die Frage, inwiefern die alleinige Manipulation des erwähnten, im periarticulären Periost befindlichen Gefässes, eine Wachstumsacceleration stimulieren kann. Nebst der chirurgischen Transsektion, könnte eventuell auch nur die alleinige Punktion oder anderswertige „Reizung“ dieser Struktur eine wachstumsfördernde Reaktion auslösen.

Eine medizinisch interessante Vision stellt die Therapie gehemmten Knochenwachstums mittels eines implantierten PTH-Hydrogels dar, welches während einer gewissen Zeit kontinuierlich lokal PTH abgibt (Publication submitted).

Literaturverzeichnis

- Adams (2000). Adams Atlas of Equine Sugery, Harcourt Canada.
- Adams (2002). Adam's Lameness in Horses, John Wiley & Sons.
- Adkins, A. (2006). Assessment and treatment of choice for correction of angular limb deformities in the foal. 13th ESVOT Congress. München, Deutschland.
- Alvarez, J., J. Horton, et al. (2001). "The perichondrium plays an important role in mediating the effects of TGF-beta1 on endochondral bone formation." Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists 221(3): 311-321.
- Alvarez, J., P. Sohn, et al. (2002). "TGFbeta2 mediates the effects of hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression." Development 129(8): 1913-1924.
- Auer, J. and J. Stick (2006). Equine Surgery. Equine Surgery (ed. 3). J. Auer and J. Stick. St. Louis, Saunders Elsevier: pp 1130-1150.
- Auer, J. A. and R. J. Martens (1982). "Periosteal transection and periosteal stripping for correction of angular limb deformities in foals." Am J Vet Res 43(9): 1530-1534.
- Bakker, B., B. C. van der Eerden, et al. (2003). "Effect of x-irradiation on growth and the expression of parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog in the tibial growth plate of the rat." Hormone research 59(1): 35-41.
- Beck, A., L. Kinzl, et al. (2001). "[Fractures involving the distal femoral epiphysis. Long-term outcome after completion of growth in primary surgical management]." Der Unfallchirurg 104(7): 611-616.
- Bertone, A. L., R. D. Park, et al. (1985). "Periosteal transection and stripping for treatment of angular limb deformities in foals: radiographic observations." J Am Vet Med Assoc 187(2): 153-156.
- Bertone, A. L., A. S. Turner, et al. (1985). "Periosteal transection and stripping for treatment of angular limb deformities in foals: clinical observations." J Am Vet Med Assoc 187(2): 145-152.
- Bramlage LR, A. J. (2006). "Diagnosis, Assesment, and Treatment Strategies for Angular Limb Deformities in the Foal." Clin Tech Equine Pract 5:259-269.
- Chung, U. I., B. Lanske, et al. (1998). "The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(22): 13030-13035.

- Chung, U. I., E. Schipani, et al. (2001). "Indian hedgehog couples chondrogenesis to osteogenesis in endochondral bone development." The Journal of clinical investigation 107(3): 295-304.
- Colnot, C., C. Lu, et al. (2004). "Distinguishing the contributions of the perichondrium, cartilage, and vascular endothelium to skeletal development." Dev Biol 269(1): 55-69.
- Gladbach, B., J. Pfeil, et al. (2000). "[Percutaneous epiphyseodesis. Correction of leg length inequalities and frontal plane deformities]." Der Orthopade 29(1): 2-8.
- Habermehl, K. H. (1975). Die Altersbestimmung bei Haus- und Labortieren. Berlin & Hamburg, Paul Parey.
- Huch, K., S. Kleffner, et al. (2003). "PTHrP, PTHr, and FGFR3 are involved in the process of endochondral ossification in human osteophytes." Histochemistry and cell biology 119(4): 281-287.
- Juppner, H. (1995). "Functional properties of the PTH/PTHrP receptor." Bone 17(2 Suppl): 39S-42S.
- Juppner, H. (2000). "Role of parathyroid hormone-related peptide and Indian hedgehog in skeletal development." Pediatric nephrology 14(7): 606-611.
- Kronenberg, H. M. and U. Chung (2001). "The parathyroid hormone-related protein and Indian hedgehog feedback loop in the growth plate." Novartis Foundation symposium 232: 144-152; discussion 152-147.
- Kronenberg, H. M., B. Lanske, et al. (1998). "Functional analysis of the PTH/PTHrP network of ligands and receptors." Recent progress in hormone research 53: 283-301; discussion 301-283.
- Ogilvie, J. W. and K. King (1990). "Epiphysiodesis: two-year clinical results using a new technique." Journal of pediatric orthopedics 10(6): 809-811.
- Pateder, D. B., R. A. Eliseev, et al. (2001). "The role of autocrine growth factors in radiation damage to the epiphyseal growth plate." Radiation research 155(6): 847-857.
- Provot, S. and E. Schipani (2005). "Molecular mechanisms of endochondral bone development." Biochem Biophys Res Commun 328(3): 658-665.
- Read, E. K., M. R. Read, et al. (2002). "Effect of hemi-circumferential periosteal transection and elevation in foals with experimentally induced angular limb deformities." J Am Vet Med Assoc 221(4): 536-540.
- Samuelson, D. A. (2007). Textbook of Veterinary Histology. Textbook of Veterinary Histology. D. A. Samuelson. St. Louis, Missouri 63146, Saunders Elsevier: pp 115-121.

Segre, G. V. and K. Lee (2001). "Endochondral Bone Formation: Regulation by Parathyroid Hormone-Related Peptide, Indian Hedgehog, and Parathyroid Hormone." The Parathyroids (Second Edition).

Semevolos, S. A., M. L. Strassheim, et al. (2005). "Expression patterns of hedgehog signaling peptides in naturally acquired equine osteochondrosis." Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society 23(5): 1152-1159.

Serra, R., A. Karaplis, et al. (1999). "Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)-dependent and -independent effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on endochondral bone formation." The Journal of cell biology 145(4): 783-794.

Tiet, T. D. and B. A. Alman (2003). "Developmental pathways in musculoskeletal neoplasia: involvement of the Indian Hedgehog-parathyroid hormone-related protein pathway." Pediatric research 53(4): 539-543.

van der Eerden, B. C., M. Karperien, et al. (2000). "Expression of Indian hedgehog, parathyroid hormone-related protein, and their receptors in the postnatal growth plate of the rat: evidence for a locally acting growth restraining feedback loop after birth." Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research 15(6): 1045-1055.

van der Eerden, B. C., M. Karperien, et al. (2003). "Systemic and local regulation of the growth plate." Endocrine reviews 24(6): 782-801.

Vortkamp, A. (2003). Molekulare Kontrolle der Skelettdifferenzierung. Jahrbuch 2003, Max-Planck-Institut für molekulare Genetik Berlin. Berlin, Deutschland.

Vortkamp, A., K. Lee, et al. (1996). "Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein." Science 273(5275): 613-622.

Wenzel, H. (2003). Identifizierung neuer Zielgene im Indian-Hedgehog Signalweg. Doktorarbeit Digitale Dissertation, Freie Universität Berlin.

Wessel, L. and C. Seyfriedt (1996). "Leg length inequality after childhood femoral fractures--permanent or temporary phenomenon?" Der Unfallchirurg 99(4): 275-282.

Yoon, B. S., R. Pogue, et al. (2006). "BMPs regulate multiple aspects of growth-plate chondrogenesis through opposing actions on FGF pathways." Development 133(23): 4667-4678.

Abkürzungsverzeichnis

ALD	Angular Limb Deformities
BMP	Bone Morphogenetic Protein
ECM	Extracelluläre Matrix
FGF	Fibroblast Growth Factor
FZ	Färbung Zone
GP	Growth Plate/Wachstumsfuge
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
Ihh	Indian Hedgehog
IZ	Intensität Zone
M	Mouse
M1-3	Messbereich 1-3
MMP	Matrix-Metalloproteinase
OP	Operation
oP	observed Power (Zuverlässigkeit)
PBS	Phosphate Buffer Saline
Pct1	Patched 1
Post OP	Post Operationem
PTE	Periosteal Transection and Elevation (Periosteal Stripping)
PTH	Parathyroid Hormone
PTHR	Parathyroid Hormone Receptor
PTHrP	Parathyroid Hormone related Peptide
R	Rabbit
RT	Raumtemperatur
Sig.	Signifikanz
Smo	Smoothened
TGF	Transforming Growth Factor
TTB	Temporary Transphseal Bridging
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Z1	Zone 1, Reservezone
Z2	Zone 2, proliferative (Säulenknorpel-) Zone
Z3	Zone 3, hypertrophe Zone

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 2.1 Fohlen mit ALD (Photo Prof. J.A. Auer)
- Abb. 2.2 Korrektive Osteotomien und Ostektomien (M. Haab, Vetsuisse fakultät Zürich)
- Abb. 2.3 Histologischer Aufbau der Epiphysenfuge (S. Tanner)
- Abb. 2.4 Feedbackloop Ihh <-> PTHrP/PTH (M. Haab, Vetsuisse Fakultät Zürich)
- Abb. 3.1 Einteilung der Schafe in Versuchsgruppen
- Abb. 3.2 Schematische Darstellung PTE/Periosteal Stripping (M. Haab, Vetsuisse Fakultät Zürich)
- Abb. 3.3 Schematische Darstellung Messpunkte einer Epiphysenfuge (S. Tanner)
- Abb. 3.4 Immunhistochemisch präparierte GP-Schnitte im Lichtmikroskop
- Abb. 3.5 GP-Längenmessung anhand von 4 Fixpunkten im HE-Schnitt (S. Tanner)
- Abb. 4.1 Durchschnittliche Farbintensität Operierte vs. Kontrollproben
- Abb. 5.1 Durchschnittliche Farbintensität unterschiedlicher GP-Zonen von Radius und Tibia bezüglich Marker Ihh
- Abb. 5.2 Durchschnittliche Farbintensität unterschiedlicher GP-Zonen von Radius und Tibia bezüglich Marker PTHrP
- Abb. 5.3 Durchschnittliche Farbintensität unterschiedlicher GP-Zonen von Radius und Tibia bezüglich Marker PTHR
- Abb. 5.4 Durchschnittliche Farbintensität unterschiedlicher GP-Zonen von Radius und Tibia bezüglich Marker TGF_{β}
- Abb. 5.5 Durchschnittliche Farbintensität unterschiedlicher GP-Zonen von Radius und Tibia bezüglich Marker FGF_2

Danksagung

Besonders danken möchte ich **Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg**, Leiterin der Musculoskeletal Research Unit (MSRU), für die Überlassung des Themas sowie die von grossem fachlichen und persönlichen Einsatz geprägte Betreuung der Arbeit und die erbrachte Geduld.

Herzlichen Dank Herrn **Prof. Dr. Hans Geyer**, emeritierter Leiter des veterinär-anatomischen Instituts der Universität Zürich, für seine fachlichen Inputs, konstruktiven Anregungen und die positive Unterstützung.

Herrn **Prof. Dr. Jörg A. Auer**, Direktor der Pferdeklinik der Universität Zürich, möchte ich für die Überlassung des Themas danken.

Gedankt sei **Dr. Jan Kümmerle**, Oberassistent der Pferdeklinik der Universität Zürich, für seine wertvolle Mitarbeit bei dieser Studie.

Vielen Dank auch Frau **Dr. Monika Hilbe und Kati Zlinsky**, Institut für Veterinärpathologie der Universität Zürich, für die histologische und immunhistochemische Bearbeitung der Proben.

Vielen Dank auch **Käthi Kämpf** und den restlichen Mitarbeitern der MSRU für ihre stete Unterstützung vor Ort.

Danken möchte ich **PD Dr. Annette Liesegang**, Institut für Tierernährung der Universität Zürich, für ihre Inputs und Ermunterungen.

Von Herzen danke ich an dieser Stelle meinem Partner **Tobias Gsell** und meiner Familie **Catherine, Hans-Ruedi** und ganz speziell **Mélanie Tanner**, für ihre jahrelange Unterstützung und ihren Glauben an mich.

Curriculum Vitae

Silvie Valérie Tanner

Geburtsdatum: 15. März 1980

Geburtsort: Zürich

Nationalität: CH

Heimatort: Meilen

Schulausbildung:

- | | |
|-------------|--|
| 1987 – 1993 | Primarschule in Feldmeilen, ZH |
| 1993 – 2000 | Gymnasium Rämibühl in Zürich, Matura Typus B |

Studium:

- | | |
|-------------|---|
| 2000 – 2005 | Studium der Veterinärmedizin, Universität Zürich, CH |
| 2005 | Staatsecamen der Vetsuiss-Fakultät, Universität Zürich, CH |
| 2008 – 2009 | Internship, Tierärztliche Spezialistenklinik Hünenberg, Zug, CH |
| 2005-2014 | Anfertigung der Dissertation
unter der Leitung von Porf. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg
am Departament für Pferde, Direktor: Prof. med. vet. Anton Fürst |

Arbeitsstellen:

- | | |
|-------------|---|
| 2012 - ... | Assistenzstelle bei Dr. Denise Lombard, Lenzburg, CH |
| 2011 - 2012 | Assistenzstelle bei Tierarztpraxis Carmen Müller, Geroldswil, CH |
| 2009 - 2011 | Assistenzstelle bei Bessy's Kleintierklinik, Dres. I. & R. Vannini, Regensdorf, CH |
| 2008 - 2009 | Internship und Assistenz (15 Mte.) an der Kleintierklinik Rigiplatz
Cham/Tierärztliche Spezialistenklinik, Hünenberg, CH |
| 2007-2014 | Doktorandin von Prof. Brigitte von Rechenberg, Leiterin der Musculoskeletal
Research Unit der Vetsuisse Fakultät Zürich |
| Sommer 2003 | Röntgenassistenz am Tierspital der Vetsuisse-Fakulät der Universität Zürich, CH |